

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

Barcelona 2023

Estudi del metabolisme lipídic perifèric i de l'apolipoproteïna J en l'angiopatia amiloide cerebral

ANNA BONATERRA PASTRA

Programa de Doctorat en Neurociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Institut de Neurociències

Vall d'Hebron Institut de Recerca

Directora:

Dra. Mar Hernández Guillamon

Tutor:

Dr. Joan Montaner

Aquesta Tesi Doctoral s'ha dut a terme al Laboratori d'Investigació Neurovascular de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron (VHIR). Aquest estudi ha estat finançat per l'Institut de Salut Carlos III (PI17/00275 y PI20/00465) i co-finançat per l'European Regional Development Fund (FEDER). El Laboratori d'Investigació Neurovascular pertany a la xarxa RICORS-ICTUS-Enfermedades Vasculares Cerebrales, ISCIII, Spain (RD21/0006/0007).

Índex de contingut

Abreviacions	5
Resum	9
Resumen	11
Abstract	13
Introducció	15
1. β-amiloïdosi cerebral	17
1.1 Producció d'A β	17
1.2 Eliminació d'A β cerebral	18
2. Angiopatia amiloide cerebral (AAC)	21
2.1 Aspectes clínics de l'AAC	21
2.2 Fisiopatologia de l'AAC	23
2.3 Diagnòstic d'AAC	25
2.4 Tractament de l'AAC	28
2.5 Marcadors de l'AAC	29
2.5.1 Marcadors de neuroimatge de l'AAC	29
2.5.2 Marcadors bioquímics d'AAC	34
2.5.3 Factors genètics associats a l'AAC	35
3. Malaltia d'Alzheimer (MA)	37
3.1 Aspectes clínics de la MA	37
3.2 Fisiopatologia de la MA	38
3.3 Diagnòstic de la MA	39
3.4 Tractament de la MA	40
3.5 Marcadors de MA	41
3.5.1 Marcadors de neuroimatge de la MA	41
3.5.2 Marcadors bioquímics de la MA	42
3.5.3 Factors genètics associats a la MA	44
4. Models animals de β-amiloïdosi cerebral	45
5. Metabolisme lipídic en β-amiloïdosi cerebral	47
5.1 Lipoproteïnes	47
5.2 Relació entre el metabolisme lipídic i la β -amiloïdosi cerebral	49
5.2 Apolipoproteïna E (ApoE)	51
5.3 Apolipoproteïna J (ApoJ)	53
Objectius	57

Mètodes	61
1. Estudis clínics.....	63
1.1 Poblacions d'estudi.....	63
1.1.1 Pacients amb sospita clínica d'AAC.....	63
1.1.2 Pacients amb MA	64
1.1.3 Pacients amb hemorràgia intracerebral aguda	64
1.1.4 Participants controls	65
1.2 RMN cerebral.....	67
1.3 Obtenció de mostres de plasma	68
1.4 Aïllament i composició de lipoproteïnes	68
1.5 Determinació dels nivells d'apolipoproteïnes en plasma.....	69
1.6 Determinació del perfil lipídic en plasma	70
1.7 Anàlisi genètic.....	71
2. Producció i purificació de proteïna ApoJ recombinant humana (rhApoJ).....	71
2.1 Cultius cel·lulars per producció de rhApoJ.....	71
2.1.1 Manteniment i subcultiu de cèl·lules HEK293.....	72
2.1.2 Transfecció de cèl·lules HEK293	72
2.1.3 Emmagatzematge de cèl·lules (congelació i descongelació)	73
2.1.4 Cultiu de HEK293T en HYPERFlask®.....	74
2.2 Purificació de rhApoJ en el sistema AKTA.....	74
2.3 Comprovació de la puresa i càlcul de la concentració	75
3. Estudi pre-clínic: tractament amb rhApoJ en el model de ratolí transgènic APP23.....	76
3.1 Línia de ratolins APP23	76
3.2 Administració in vivo de rhApoJ	77
3.3 Obtenció de mostres i preparació de teixits	78
3.4 RMN cerebral ex vivo	79
3.5 Homogenats cerebrals.....	80
4. Mètodes generals	80
4.1 Tincions de teixit cerebral.....	80
4.1.1 Tinció amb Thioflavina S (ThS).....	80
4.1.2 Tinció amb resorufina.....	81
4.1.3 Immunohistoquímica (IHQ)	81
4.1.4 Immunofluorescència (IF).....	82
4.1.5 Visualització i quantificació de les tincions.....	83

4.2 Electroforesi i Western Blot	83
4.3 ELISAs simples i multiplex	84
5. Anàlisi estadístic	85
Resultats.....	87
1. Association of candidate genetic variants and circulating levels of ApoE/ApoJ with common neuroimaging features of Cerebral Amyloid Angiopathy	89
2. Comparison of Plasma Lipoprotein Composition and Function in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease	127
3. The presence of circulating human Apolipoprotein J reduces the number of cerebral microbleeds associated with cerebral amyloid angiopathy in mice	145
Discussió.....	181
1. Estudi de marcadors radiològics en una cohort amb HIC lobar i sospita d'AAC	183
1.1 Associacions genètiques amb marcadors radiològics comuns en l'AAC.....	183
1.1.1 Associacions genètiques de risc/protecció en la MA i l'AAC	184
1.1.2 Genotip de CLU en l'AAC	185
1.1.3 Genotip d'APOE en l'AAC	186
1.2 Relació entre ApoJ i ApoE circulants i marcadors de neuroimatge característics de l'AAC.....	187
1.3 Limitacions de l'estudi i perspectives de futur per l'estudi de marcadors radiològics de malaltia de petit vas associats a l'AAC	188
2. Comparació del perfil lipídic en pacients amb β-amiloïdosi cerebral	188
2.1 Nivells de colesterol en β -amiloïdosi cerebral.....	189
2.2 Distribució d'apolipoproteïnes en la β -amiloïdosi cerebral.....	191
2.3 Propietats arterioescleròtiques en β -amiloïdosi cerebral	192
2.4 Limitacions de l'estudi i potencial del perfil lipídic com a biomarcador	193
3. Potencial terapèutic de rhApoJ	194
3.1 Efecte de rhApoJ en la presència de lesions hemorràgiques i els nivells d'A β cerebrals	195
3.2 Efecte de rhApoJ en la micròglia i inflamació.....	196
3.3 Efecte de rhApoJ en els nivells plasmàtics de MMP-12	197
3.4 Limitacions i perspectives de futur per l'ApoJ i la MMP-12.....	199
Conclusions	201
Bibliografia	205
Annexes.....	243

Abreviacions

AAC: angiopatia amiloide cerebral

AACi: AAC inflamatòria

ABC: de l'anglès, *ATP-binding cassette*

ACE: enzim convertidor de l'angiotensina, de l'anglès, *angiotensin-converting enzyme*

AICD: de l'anglès, *amyloid precursor protein intracellular domain*

AQP4: aquaporina 4

APH-1: de l'anglès, *anterior pharynx defective-1*

ApoA-I: apolipoproteïna A-I

ApoA-II: apolipoproteïna A-II

ApoB-100: apolipoproteïna B-100

ApoC: apolipoproteïna C

ApoC-III: apolipoproteïna C-III

ApoE: apolipoproteïna E

ApoJ: apolipoproteïna J

ARIA: anomalies d'imatge associades a l'amiloide, de l'anglès, *amyloid-related imaging abnormalities*

A β : β -amiloide

BCA: àcid bicinconínic

BHE: barrera hematoencefàlica

BOMBS: de l'anglès, *Brain Observer Microbleed Scale*

BSA: albúmina de sèrum boví, de l'anglès, *Bovine Serum Albumin*

C83/99: fragments C-terminal de 83/99 aminoàcids

CAA-SVDB: de l'anglès, *cerebral amyloid angiopathy- small vessel disease burden*

CCL3: de l'anglès, *chemokine (C-C motif) ligand 3*

CERAD: de l'anglès, *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

CHI3L1: de l'anglès, *Chitinase-3-like protein 1*

CI: interval de confiança

Clu: clusterina

Col: colesterol

CoIE: colesterol esterificat

CR1: el gen del receptor del complement 1, de l'anglès, *complement receptor 1*

CSO: centrum semiovale

CXCL1: de l'anglès, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*

DAB: diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DL: dislipèmia

DM: diabetis mellitus

DMEM: Dulbecco-modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfòxid

DPX: Dibutilftalat Poliestirè Xilè

EDTA: àcid etilendiamintetraacètic

ELISA: de l'anglès, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EMA: European Medicines Agency

EPV: espais perivascular

EPVD: espais perivasculars dilatats

etOH: etanol

FA: fibril·lació auricular

FBS: sèrum boví fetal, de l'anglès, *fetal bovine sèrum*

FDA: de l'anglès, *Food and Drug Administration*

FL: fosfolípid

FLAIR: recuperació d'inversió atenuada per fluids, de l'anglès, *fluid-attenuated inversion recovery*

FDG: Fluorodesoxiglucosa

GAP-43: de l'anglès, *Growth Associated Protein 43*

GB: ganglis basals

GFAP: proteïna àcida fibril·lar glial

GWAS: estudi d'associació genòmica, de l'anglès, *genòmic wide association study*

HDL: de l'anglès, *high density lipoprotein*

HEK293: de l'anglès, *Human embryonic kidney 293 cells*

HEK293T: HEK293 transfectades

HIC: hemorràgia intracerebral

HRP: estreptavidina conjugada amb peroxidasa, de l'anglès, *streptavidin-horseradish peroxidase*

HSA: hemorràgia subaracnoidal

HTA: hipertensió arterial

IDE: de l'anglès, *Insulin degrading enzyme*

IDL: de l'anglès, *intermediate density lipoprotein*

IF: Immunofluorescència

IgG: Immunoglobulina G

IHQ: Immunohistoquímica

IL17: interleuquina-17

IPAD: de l'anglès, *intramural periarterial drainage*

ISF: de l'anglès, *Interstitial fluid*

KC: quimioatració de queratinòcits de l'anglès, *Keratinocyte chemoattractant*

LDL: de l'anglès, *low density lipoprotein*

LDLR: receptor de LDL

LCR: líquid cefalorraquídi

LDLR: receptors de la família de lipoproteïnes de baixa densitat, de l'anglès, *low density lipoprotein receptors*

Lp-PLA₂: fosfolipasa A₂ associada a les lipoproteïnes, de l'anglès, *lipoprotein-associated phospholipase A₂*

LPL: lipasa de lipoproteïnes

LRP1: de l'anglès, *low-density lipoprotein receptor-related protein 1*

LSB: lesions de substància blanca

MA: malaltia d'Alzheimer

MCP-1: proteïna quimiotàctica de monòcits

MFGE-8: de l'anglès, *Milk fat globule-EGF factor 8 protein*

MIP-1 α : de l'anglès, *macrophage inflammatory protein-1 alpha*

miRNA: microRNA

MMP: metal·loproteïnases de matriu, de l'anglès, *matrix metalloproteinase*

MMSE: de l'anglès, *mini-mental state examination*

NEP: neprilisina

NfL: de l'anglès, *neurofilament light chain*

NGRN: neurogranin

NIA-AA: de l'anglès, *National Institute of Aging and Alzheimer's Association*

NOAC: de l'anglès, *Non-vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant*

ON: durant la nit, de l'anglès, *overnight*

OR: odds ratio

P-gp: P-glicoproteïna

p-tau: tau fosforilada

P/S: penicil·lina/estreptomicina

PARIAS: de l'anglès, *Patients At Risk of Ischemic Acute Stroke*

PBS: de l'anglès, *phosphate-buffered saline*

PBST: PBS amb 0.2% Tritó

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PDGFR β : de l'anglès, *platelet-derived growth factor receptor- β*

PFA: paraformaldehid

PEN-2: de l'anglès, *presenilin enhancer 2*.

PET: tomografia per emissió de positrons, de l'anglès, *positron emission tomography*

PiB: [¹¹C]-Pittsburgh Compound B

PON-1: paraoxonasa 1

PS1/2: presenilina 1/2

PPA: proteïna precursora amiloide

PrP: proteïnes priòniques

rhApoJ: ApoJ recombinant humana

RAGE: de l'anglès, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*

RMN: ressonància magnètica nuclear

RT: de l'anglès, *room temperature*

SD: desviació estàndard

SNAP-25: de l'anglès, *Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa*

SNP: polimorfisme de nucleòtids simples, de l'anglès, *single nucleotide polymorphism*

sPPA α/β : fragments solubles de la proteïna precursora amiloide α/β

SSc: siderosi superficial cortical

sTREM2: de l'anglès, *soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2*

SYT-1: sinaptotagmina-1, de l'anglès, *synaptotagmin-1*

TBS: salí tamponat amb Tris, de l'anglès, *Tris Buffer Saline*

ThS: Thioflavina S

TG: triglicèrid

uPA: activador de la plasminogen tipus uroquinasa

UV: ultraviolada

VILIP-1: de l'anglès, *Visinin like protein 1*

VLDL: de l'anglès, *very low density lipoprotein*.

WB: Western Blot

WT: salvatge, de l'anglès, *wild-type*

Resum

La β -amiloïdosi cerebral consisteix en el dipòsit de β -amiloide ($A\beta$) al cervell, acumulant-se al parènquima en la malaltia d'Alzheimer (MA) o als vasos sanguinis en l'angiopatia amiloide cerebral (AAC). L'AAC és la principal causa d'hemorràgia intracerebral (HIC) lobar en poblacions d'edat avançada i presenta diferents aspectes fisiopatològics representats per marcadors radiològics, com els microsagnats corticals, tot i que molts dels mecanismes biològics subjacents encara es desconeixen. Diferents proteïnes codepositen amb l' $A\beta$, entre elles l'apolipoproteïna J (ApoJ) i l'apolipoproteïna E (ApoE), les quals estan codificades per gens (CLU i APOE) considerats factors genètics implicats en la β -amiloïdosi cerebral. L'objectiu general d'aquesta tesi és profunditzar en l'estudi del metabolisme lipídic perifèric, incloent el paper d'ApoJ i d'ApoE, en l'AAC, així com valorar possibles biomarcadors i tractaments per aquesta malaltia.

Inicialment, vam realitzar un estudi multicèntric amb 126 pacients amb HIC lobar i sospita d'AAC. L'objectiu era caracteritzar la cohort i identificar polimorfismes de nucleòtids simples (SNPs) associats a marcadors de ressonància magnètica nuclear (RMN) característics de l'AAC, així com estudiar la distribució d'ApoJ i ApoE en lipoproteïnes plasmàtiques en aquesta cohort. Els resultats van mostrar que diferents SNPs, especialment de CLU, s'associaven a marcadors de RMN de manera independent. A més, SNPs de CLU i al·lels d'APOE, prèviament descrits com a protectors per la MA, s'associaven a un major contingut d'ApoJ i ApoE en lipoproteïnes, respectivament. Alhora, els nivells d'ApoJ i ApoE en diferents lipoproteïnes també s'associaven a marcadors de RMN, com els espais perivasculars dilatats al centrum semiovale. Aquests resultats suggeririen que majors nivells d'ApoJ i ApoE a les lipoproteïnes poden tenir propietats protectores en l'AAC.

Seguidament, vam pretendre comparar el perfil lipídic d'una subcohort de pacients amb HIC lobar associada a l'AAC (N=51) respecte pacients amb MA (N=60) i controls (N=60). Els resultats van mostrar que la cohort d'HIC-AAC presentava alteracions lipídiques amb un perfil ateroprotector, amb nivells menors de colesterol total i LDL, mentre que els pacients amb MA no mostraven alteracions respecte els controls. A més, vam trobar menors nivells d'ApoA-II en plasma i una redistribució de l'apolipoproteïna C-III (ApoC-III) de les lipoproteïnes de densitat alta (HDL) a les lipoproteïnes de densitat molt baixa (VLDL), amb una ràtio elevada d'ApoE/ApoC-III a les HDL en el grup HIC-AAC. Aquests

resultats destaquen la rellevància del metabolisme lipídic en l'AAC, confirmant que nivells elevats d'ApoE a les HDL podrien implicar una resposta protectora.

Finalment, vam realitzar un estudi pre-clínic en un model transgènic de β -amiloïdosi per determinar l'impacte de l'augment d'ApoJ circulant. En concret, vam administrar ApoJ recombinant humana (rhApoJ) crònicament a ratolins APP23 envellits i vam realitzar RMN cerebral per detectar lesions hemorràgiques. Els ratolins tractats amb rhApoJ van presentar menys lesions hemorràgiques corticals que els ratolins tractats amb salí, sense detectar-se canvis en els nivells d'A β insoluble en cervell. Per altra banda, el tractament amb rhApoJ va promoure un augment dels nivells plasmàtics de Gro- α i MIP-1 α i una reducció en els de metal·loproteïnasa de matriu (MMP)-12. Per determinar la possible rellevància clínica d'aquests resultats, vam analitzar mostres plasmàtiques de 17 controls i 40 pacients amb HIC aguda. Vam observar una associació entre el volum i la irregularitat de l'hemorràgia amb els nivells plasmàtics de MMP-12 en mostres de pacients amb HIC lobar. Així, proposem que l'increment dels nivells perifèrics d'ApoJ previndrien el dany cerebrovascular associat a l'AAC, en part a través de la modulació dels nivells circulants de MMP-12.

Considerem que aquesta tesi doctoral aporta informació clínica i biològica rellevant sobre el rol del metabolisme lipídic perifèric en l'AAC, així com del paper d'ApoJ i MMP-12 en la presència d'hemorràgies cerebrals en un context de β -amiloïdosi cerebral.

Resumen

La β -amilodosis cerebral consiste en el depósito de β -amiloide ($A\beta$) en el cerebro, acumulándose en el parénquima en la enfermedad de Alzheimer (EA) o en los vasos sanguíneos en la angiopatía amiloide cerebral (AAC). La AAC es la principal causa de hemorragia intracerebral (HIC) lobar en población de edad avanzada y presenta distintos aspectos fisiopatológicos representados por marcadores radiológicos, como microsangrados corticales, aunque muchos de los mecanismos biológicos subyacentes siguen siendo desconocidos. Distintas proteínas codepositan con $A\beta$, como la apolipoproteína J (ApoJ) y la apolipoproteína E (ApoE), que están codificadas por genes (CLU y APOE) considerados factores genéticos implicados en la β -amilodosis cerebral. El objetivo de esta tesis es el estudio del metabolismo lipídico periférico, incluyendo los roles de ApoJ y ApoE, en la AAC, así como evaluar posibles biomarcadores y tratamientos para esta enfermedad.

Primeramente, realizamos un estudio multicéntrico con 126 pacientes con HIC lobar y sospecha clínica de AAC. El objetivo era caracterizar la cohorte e identificar polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) asociados a marcadores de resonancia magnética nuclear (RMN) característicos de la AAC, así como estudiar la distribución de ApoJ y ApoE en lipoproteínas plasmáticas. Los resultados mostraron que distintos SNPs, especialmente de CLU, se asociaban a marcadores de RMN. Además, SNPs de CLU y alelos de ApoE, previamente descritos como protectores para la EA, se asociaban a un mayor contenido de ApoJ y ApoE en lipoproteínas. Los niveles de ApoJ y ApoE en distintas lipoproteínas también se asociaron a marcadores de RMN, como espacios perivasculares dilatados en el centrum semiovale. Estos resultados sugerirían que mayores niveles de ApoJ y ApoE en lipoproteínas pueden tener propiedades protectoras en la AAC.

Seguidamente, comparamos el perfil lipídico de una subcohorte de pacientes con HIC lobar asociada a la AAC (N=51) respecto a pacientes con EA (N=60) y controles (N=60). Los resultados mostraron que la cohorte HIC-AAC presentaba alteraciones lipídicas con un perfil ateroprotector con niveles menores de colesterol total y LDL, mientras que pacientes con EA no mostraron alteraciones respecto a controles. Además, observamos menores niveles plasmáticos de ApoA-II y una redistribución de la apolipoproteína C-III (ApoC-III) de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a las lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL), con una ratio elevada de ApoE/ApoC-III en las HDL de HIC-AAC. Estos

resultados destacan la relevancia del metabolismo lipídico en la AAC, confirmando que niveles elevados de ApoE en las HDL podrían implicar una respuesta protectora.

Finalmente realizamos un estudio preclínico para determinar el impacto del aumento de ApoJ circulante en un modelo transgénico de β -amilodosis. Concretamente, administramos ApoJ recombinante humana (rhApoJ) crónicamente a ratones APP23 envejecidos y realizamos RMN cerebral para detectar lesiones hemorrágicas. Los ratones tratados con rhApoJ presentaron menos lesiones hemorrágicas corticales que ratones tratados con salino, sin detectarse cambios en los niveles de A β insoluble cerebrales. Además, el tratamiento con rhApoJ promovió un aumento de niveles plasmáticos de Gro- α y MIP-1 α y una reducción en los de la metaloproteinasa de matriz (MMP)-12. Para determinar la relevancia clínica de estos resultados, analizamos muestras plasmáticas de 17 controles y 40 pacientes con HIC aguda. Observamos una asociación entre el volumen e irregularidad de la hemorragia con los niveles plasmáticos de MMP-12 en muestras de pacientes con HIC lobar. Proponemos que el incremento de niveles periféricos de ApoJ previenen el daño cerebrovascular asociado a la AAC, en parte por la modulación de niveles circulantes de MMP-12.

Consideramos que esta tesis doctoral aporta información clínica y biológica relevante sobre el rol del metabolismo lipídico periférico en la AAC, así como del papel de ApoJ y MMP-12 en la presencia de hemorragias cerebrales en un contexto de β -amilodosis cerebral.

Abstract

Cerebral β -amyloidosis is characterized by the deposition of amyloid β ($A\beta$) in the brain, in parenchyma in Alzheimer's Disease (AD) or in blood vessels in cerebral amyloid angiopathy (CAA). CAA is the main cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) in the elderly. Furthermore, CAA is associated with common radiological markers, such as cerebral microbleeds, that reflect distinct pathophysiological aspects of the disease even though the biological mechanisms underlying their occurrence and topography are still under investigation. Several proteins codeposit with $A\beta$, among them apolipoprotein J (ApoJ) and apolipoprotein E (ApoE), which are codified by the genes CLU and APOE respectively, considered genetic factors involved in cerebral β -amyloidosis. The main aim of this thesis is to further understand peripheral lipidic metabolism, including ApoJ and ApoE, in CAA, as well as assess possible biomarkers and treatments for this disease.

Initially, we performed a multicentric study with 126 patients that presented lobar ICH and clinical suspicion of CAA. The objective was to characterize the cohort and identify potential single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with common magnetic resonance imaging (MRI) markers of CAA, as well as to study ApoJ and ApoE distribution in plasma lipoproteins in the beforementioned cohort. Our results showed that different SNPs, especially from CLU, were independently associated with MRI markers. In addition, CLU SNPs and APOE alleles, previously described as protective factors for AD, were associated with a higher ApoJ and ApoE content in lipoproteins, respectively. Concurrently, ApoJ and ApoE levels in different lipoproteins were also associated with MRI markers, such as enlarged perivascular spaces in the centrum semiovale. These results suggest that higher ApoJ and ApoE lipoprotein levels could have protective properties in CAA.

In a second study, we compared the lipidic profile of a subcohort of patients with lobar ICH associated with CAA (N=51) with AD patients (N=60) and controls (N=60). Our results showed that the ICH-CAA cohort presented lipidic alterations with an atheroprotective profile with lower total and LDL cholesterol levels, while AD patients did not present alterations in the lipidic profile from controls. In addition, we found lower levels of plasma ApoA-II and a redistribution of apolipoprotein C-III (ApoC-III) from high-density lipoproteins (HDL) to very low-density lipoproteins (VLDL), with an elevated ApoE/ApoC-III HDL ratio in the ICH-CAA group. These results highlight the relevance of lipidic

metabolism in CAA, confirming that high ApoE levels in HDL could entail a protective response.

Finally, we conducted a preclinical study in a transgenic model of β -amyloidosis to determine the effect of increasing the circulating levels of ApoJ. In particular, we chronically administered recombinant human ApoJ (rhApoJ) to aged APP23 mice and performed cerebral MRI to detect hemorrhagic lesions. Mice treated with rhApoJ showed fewer cortical hemorrhagic lesions than saline-treated mice, without noticeable changes in insoluble A β brain levels. On the other hand, rhApoJ treatment induced an increase of Gro- α and MIP-1 α and a reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-12 levels in plasma. To determine the potential clinical relevance of these results, we analyzed plasma samples from 17 controls and 40 patients with an acute ICH. We observed an association between the volume and irregularity of the hemorrhage with MMP-12 plasma levels in patients presenting a lobar ICH. In conclusion, we propose that increasing ApoJ peripheral levels could prevent the cerebrovascular damage associated with CAA, partially through the modulation of MMP-12 circulating levels.

We think this doctoral thesis provides relevant clinical and biological information about the role of peripheral lipidic metabolism in CAA, as well as the potential involvement of ApoJ and MMP-12 in the presence of cerebral hemorrhages in a cerebral β -amyloidosis context.

Introducció



1. β -amiloïdosi cerebral

La β -amiloïdosi cerebral és un procés patològic que consisteix en l'acumulació de la proteïna β -amiloide ($A\beta$) al cervell. Hi ha diferents tipus de proteïna amiloide, que poden causar diferents tipus d'amiloïdosi. Tanmateix, l'amiloïdosi pot succeir de manera localitzada a un òrgan específic o de manera sistèmica tenint una afectació més genèrica (1). En el cas de la β -amiloïdosi cerebral, aquesta pot ocórrer en el parènquima, sent un dels trets característics de la malaltia d'Alzheimer (MA) o en els vasos sanguinis cerebrals causant angiopatia amiloide cerebral (AAC) (2).

1.1 Producció d' $A\beta$

El pèptid β -amiloide ($A\beta$) és el resultat del processament seqüencial de la proteïna precursora amiloide (PPA), sent expressada majoritàriament per les neurones. Tot i que la funció fisiològica de la PPA encara no està clara, s'ha suggerit que podria estar implicada en diferents processos com el desenvolupament neuronal, homeòstasi i senyalització neuronal, sinaptogènesi, transport intracel·lular i processos d'adhesió cel·lular (3). La PPA és una glicoproteïna transmembrana amb un domini extracel·lular gran i el seu processament es pot dur a terme de manera fisiològica seguint la via no amiloidogènica, o bé per la via amiloidogènica desencadenant processos patològics (4).

En condicions fisiològiques, la PPA és processada per la α -secretasa resultant en un fragment soluble (sPPA α) N-terminal que és alliberat de forma extracel·lular, i un fragment C-terminal de 83 aminoàcids (C83) que es queda ancorat a la membrana. Ara bé, aquest processament també es pot dur a terme per la via amiloidogènica. En aquest cas, la PPA és processada per la β -secretasa, resultant en un fragment soluble (sPPA β) N-terminal i un fragment C-terminal de 99 aminoàcids (C99) que es queda ancorat a la membrana. En les dues vies hi ha un segon processament dut a terme per la γ -secretasa. La γ -secretasa és un complex enzimàtic format per presenilina 1 o 2 (PS1 o PS2), APH-1 (de l'anglès, *anterior pharynx defective-1*), nicastrina i PEN-2 (de l'anglès, *presenilin enhancer 2*). La γ -secretasa és l'enzim que hidrolitza els fragments C-terminals que s'havien quedat ancorats a la membrana. En la via no amiloidogènica, la hidròlisi del pèptid C83 resulta en l'alliberació extracel·lular del pèptid p3, mentre que en la via amiloidogènica s'allibera el pèptid patològic $A\beta$. En els dos casos també es genera el pèptid AICD (de l'anglès, *amyloid precursor protein intracellular domain*) (Figura 1) (3–

6). Segons per on es produeixi la proteòlisi per part de la γ -secretasa a la via amiloidegènica es generaran pèptids $A\beta$ de diferent longitud, entre 36 i 43 aminoàcids, sent els pèptids $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ els més freqüents i de més importància patològica. El pèptid $A\beta$ es produeix en forma de monòmer, però tendeix a formar estructures de fulles β que promouen que s'agregui amb altres pèptids $A\beta$ generant oligòmers i posteriorment fibres insolubles que tendeixen a dipositar-se (3). L' $A\beta_{40}$ té una major tendència a dipositar-se en forma de fibres insolubles a la vasculatura cerebral causant AAC, mentre que l' $A\beta_{42}$, tot i que es produeix en menys quantitat que l' $A\beta_{40}$, té una capacitat d'agregació més gran i es diposita directament al parènquima sent el major component de les plaques neurítiques cerebrals que ocorren en la MA (7).

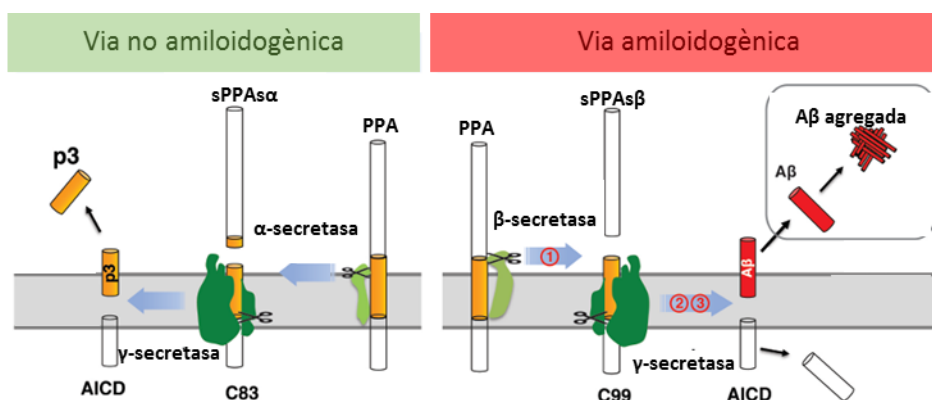


Figura 1. Representació esquemàtica del processament de PPA per la via no amiloidegènica i amiloidegènica. sPPA α i sPPA β : fraccions solubles de PPA α i β ; C83 i C99: fragments C-terminals de 83 y 99 aminoàcids respectivament. Modificada de *Zhao et al., 2020* (5).

1.2 Eliminació d' $A\beta$ cerebral

En condicions fisiològiques, hi ha una eliminació eficaç del pèptid $A\beta$, evitant la seva acumulació i deposició. Actualment es creu que l'acumulació d' $A\beta$ és deguda a un desequilibri entre la seva producció i eliminació donant lloc a processos patològics (8). Hi ha diversos mecanismes pels quals l' $A\beta$ pot ser eliminada: degradació per part d'enzims proteolítics, fagocitada per part de micròglia i astròcits, eliminada perivascularment o de manera activa a través de la barrera hematoencefàlica (BHE) (Figura 2) (9,10).

La degradació d'A β per proteòlisi enzimàtica es pot dur a terme per enzims proteolítics com la neprilisina (NEP) i l'enzim degradador de la insulina (IDE, de l'anglès, *Insulin degrading enzyme*), que s'ha vist que tenen una activitat disminuïda en cervells de pacients amb MA (11). A més, algunes metal·loproteïnases de matriu (MMP, de l'anglès, *matrix metalloproteinase*), com ara MMP2 i MMP9 també poden degradar A β (12,13).

Un altre mecanisme clau per l'eliminació d'A β consisteix en la seva fagocitosi per part de la micròglia i astròcits activats, que és un mecanisme àmpliament conegut (14). Apart de les cèl·lules residents, en condicions on hi ha acumulació d'A β s'ha observat que hi ha una infiltració de monòcits perifèrics que es diferencien a macròfags fagocítics d'A β (15). De totes maneres, és important tenir en compte que tot i que la micròglia i els macròfags poden ajudar a fagocitar i degradar l'A β , la seva relació amb la β -amiloidosi cerebral és molt complexa, i es creu que per altra banda, podrien augmentar la neuroinflamació de forma crònica, cosa que podria portar a exacerbar la patologia (16).

Per últim, trobem sistemes d'aclariment d'A β del cervell a fluids perifèrics que consisteixen en l'aclariment transendotelial a través de la BHE i el drenatge perivascular.

L'aclariment transendotelial a través de la BHE és un mecanisme molt important de depuració d'A β cap a la sang. La BHE està formada per cèl·lules endotelials, làmina basal, peus d'astròcits i pericits (17). Degut a la seva baixa permeabilitat, el transport a través de la BHE es dona de manera activa a través de transportadors específics travessant cèl·lules endotelials i pericits. En el cas de l'A β , hi ha diversos receptors que són capaços d'interaccionar amb el pèptid. Els transportadors que promouen la transcitosi d'A β més rellevants són receptors de la família de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR, de l'anglès, *Low Density Lipoprotein Receptors*) com LRP1 (de l'anglès, *low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) (18) i LRP2/megalina (19), i transportadors de la família ABC (de l'anglès, *ATP-binding cassette*) com ABCB-1/ P-glicoproteïna (P-gp) (20) o ABCA1 (21). Aquests receptors facilitarien el transport d'A β des del cervell cap a la sang, però cal tenir en compte que també hi ha receptors que permeten el transport d'A β en sentit contrari, com per exemple el transportador RAGE (de l'anglès, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) (22,23). Aquests receptors poden promoure l'aclariment d'A β unint-se tant a l'A β soluble com a complexes formats per A β i altres molècules transportadores, com l'apolipoproteïna E (ApoE) i l'apolipoproteïna J (ApoJ) (24).

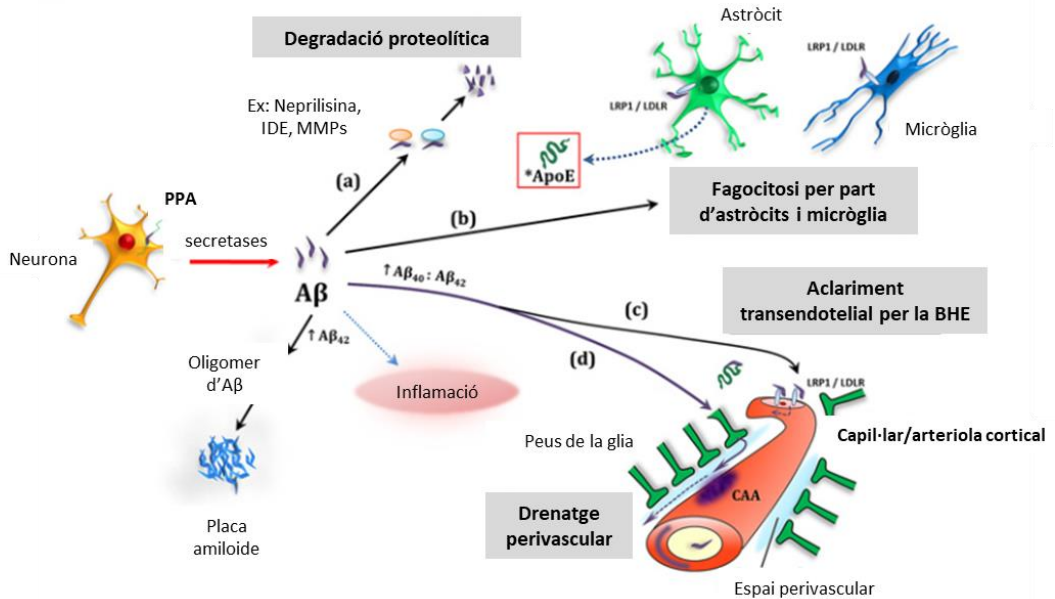


Figura 2. Representació esquemàtica de vies d'eliminació de l'Aβ: A) Degradació proteolítica. B) Captació per part de micròglia i astròcits. C) Aclariment transendotelial a través de la barrera hematoencefàlica. D) Drenatge perivascular. Adaptació de Charidimou 2012 (9).

Per altra banda, s'ha descrit el drenatge perivascular, el qual seria el responsable d'eliminar l'Aβ del líquid intersticial (ISF, de l'anglès, *Interstitial fluid*) cap al líquid cefalorraquidi (LCR) (10). Aquest procés biològic tindria lloc als espais perivasculars (EPV), que rodegen les artèries i vasos cerebrals des de l'espai subaracnoid fins al parènquima cerebral i estan envoltats de LCR. Actualment encara no es coneixen els mecanismes exactes de l'eliminació d'Aβ per aquesta via, tot i que s'han proposat 3 models: el model glimfàtic, el drenatge peri-arterial intramural (IPAD, de l'anglès, *intramural periarterial drainage*) i el mixte (de l'anglès *mixing*) (25).

El model glimfàtic es basa en l'entrada de LCR al cervell a través de les artèries (espai periarterial), el qual es mesclaria amb el ISF i sortiria del cervell per les venes (espai perivenós). És a dir, el LCR s'intercanvia amb el ISF, el qual porta residus cel·lulars per advecció, entre ells Aβ, cap als canals perivenosos que acaben anant als vasos limfàtics dirigits als nòduls limfàtics cerebrals (Figura 3A). Es creu que aquest intercanvi de fluids es du a terme gràcies al transport a través del canal d'aigua aquaporina-4 (AQP4) dels astròcits que rodegen la vasculatura cerebral (26).

El model alternatiu IPAD va ser proposat per Carare et al., (27) i en aquest cas no hi hauria un intercanvi entre LCR i ISF, sinó que degut a la vasomoció, els soluts que es troben a l'ISF s'eliminarien per les parets capil·lars i arterials passant per les membranes basals de les cèl·lules de múscul llis en direcció contrària al flux sanguini i acabant als nòduls limfàtics cerebrals (Figura 3.B) (28). En aquest model el drenatge es faria de manera intramural per les parets de les artèries i no pels EPVs. Aquest model ha pres molta importància en el món de l'AAC ja que permetria explicar perquè l'A β es troba principalment acumulada a la paret d'artèries i arterioles i no en venes (29).

Per últim, el model mixte proposa que degut a la moció fisiològica com la pulsatilitat vascular i la vasomoció, el ISF, incloent residus com l'A β , es transporta cap als EPVs arterials per difusió. A més, aquest model planteja que això només es pot dur a terme de manera específica a la superfície del cervell que és on hi ha una moció fisiològica més gran. Per tant el ISF amb A β aniria cap als EPVs periarterials i finalment cap a la superfície pial (Figura 3.C) (30).

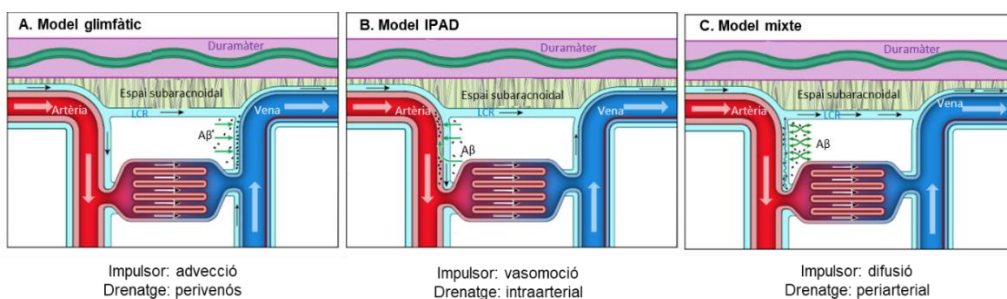


Figura 3. Eliminació d'A β cerebral a través de drenatge perivascular. A) Model glimfàtic. B) Model IPAD. C) Model mixte. Imatge adaptada de Zhao et al., (25).

2. Angiopatia amiloide cerebral (AAC)

2.1 Aspectes clínics de l'AAC

L'angiopatia amiloide cerebral (AAC) és definida com l'acumulació cerebrovascular de material amiloide (31). La forma més freqüent d'AAC consisteix en l'acumulació vascular del pèptid A β , especialment en individus d'edat avançada o amb MA (7). Tot i que l'acumulació d'A β és la més típica, hi ha altres formes d'AAC on les proteïnes acumulades són cistatina C, proteïnes prioniques (PrP) o gelsolina (7). De manera

general, l'AAC es dona de forma esporàdica associada a l'edat, però també pot ser deguda en casos poc freqüents a formes familiars hereditàries (32,33).

La major conseqüència patològica de l'AAC és una hemorràgia intracerebral (HIC) lobar de tipus no traumàtica, on hi ha una ruptura d'un vas cerebral de forma espontània causant extravasació de sang al parènquima cerebral de forma aguda. Les HIC degudes a l'AAC solen afectar regions cerebrals superficials: el còrtex, l'espai subaracnoidal, la unió cortico-subcortical i la substància blanca subcortical, sent els lòbuls occipitals els més afectats. De fet, l'AAC és la principal causa d'HIC lobar en ancians (31). En canvi, les HIC degudes a la hipertensió arterial (HTA) crònica, tot i que són la principal causa d'HIC primàries, es solen donar pel trencament de petites artèries que perforen regions profundes del cervell, afectant als ganglis basals, tàlem, cerebel i protuberància anular ("pons" en llatí) (31). Així, normalment les HIC degudes a la HTA solen tenir una localització a zones profundes del cervell, mentre que les degudes a l'AAC ocorren a localitzacions lobars. A més, la recurrència d'HIC és una complicació comuna en l'AAC, arribant a donar-se fins al 10% dels pacients l'any següent d'haver patit una HIC lobar (31,34), mentre que la recurrència d'HIC deguda a la HTA és molt menor (35,36).

Altres manifestacions clíniques importants de l'AAC són demència, deteriorament cognitiu i episodis neurològics transitoris focals que consisteixen en alteracions curtes i transitòries que poden ser motores, somatosensorials, visuals o del llenguatge (37–39). La influència de l'AAC sobre la cognició és difícil d'estudiar ja que es pot donar en pacients que hagin patit o no una HIC (40), i l'AAC es dona de manera freqüent en pacients que també presenten MA, cosa que dificulta separar la simptomatologia. Tot i així, està àmpliament acceptat que l'AAC és causa de demència de manera independent de la MA, tant a nivell d'augmentar la probabilitat de patir demència com la severitat d'aquesta (37,38,41). El deteriorament cognitiu típic de l'AAC consisteix en un declivi de la cognició global, així com una menor velocitat de percepció, i deteriorament de la memòria episòdica i semàntica (41). Cal destacar que hi ha una condició aguda associada a l'AAC coneguda com AAC inflammatòria (AACi), on hi ha una resposta inflammatòria vascular al voltant dels dipòsits amiloides. Aquesta condició pot tenir simptomatologia variada, combinant deteriorament cognitiu amb cefalees, episodis neurològics focals i crisis epilèptiques (42).

És important recalcar que el desenvolupament de l'AAC no es correlaciona amb la presència de factors de risc comuns en altres malalties cerebrovasculars com serien la HTA, diabetis mellitus (DM) o hiperlipèmia (43). En canvi, els majors factors de risc per patir AAC simptomàtica són tenir MA, i la presència dels al·lels ApoE- ϵ 2 i - ϵ 4 (44). Cal tenir en compte que l'AAC és una malaltia molt heterogènia i complexa, i sol trobar-se en pacients que alhora presenten altres malalties de petit vas o MA. Per això, i perquè el diagnòstic definitiu només es pot realitzar a través d'un examen histopatològic cerebral, és molt difícil determinar la incidència i prevalença de la malaltia. Un meta-anàlisi recent de 170 estudis que incloïa més de 73.000 pacients va determinar que a partir de proves histopatològiques la prevalença d'AAC de moderada a severa en la població envellida general és d'un 23%, mentre que en pacients amb MA és del 48%. En casos que han patit una HIC lobar, la prevalença d'AAC de moderada a severa és del 57% (95% CI: 41.7-71.0) (45).

2.2 Fisiopatologia de l'AAC

L'AAC es caracteritza per l'acumulació de dipòsits d'A β a la túnica mitja i adventícia dels vasos corticals i de les leptomeninges, arterioles, capil·lars i en menor freqüència venes (43). L'AAC es pot classificar en 2 tipus segons el tipus de vas afectat. L'AAC de tipus 1, també anomenada AAC capil·lar, es dona quan hi ha deposició d'A β a capil·lars cerebrals sense tenir en compte si hi ha deposició d'A β a altres tipus de vasos. L'AAC de tipus 2 consisteix en l'acumulació d'A β vascular de manera específica a artèries corticals i de les leptomeninges, i amb una absència total d'A β als capil·lars (46). De forma general, els dipòsits d'A β vascular comencen a aparèixer al neocòrtex i s'extenen cap a l'al·locòrtex i cerebel (47). Les parts cerebrals afectades solen ser regions cerebrals lobars posteriors, sobretot la regió occipital (47).

Actualment hi ha un sistema de classificació neuropatològic segons la gravetat de la lesió al vas on ocorre l'AAC que és una escala de 0 a 4 graus definida per Vonsattel et al. És una escala histopatològica que consisteix en: 0: absència d'A β , 1: dipòsits d'A β clapejats en un vas amb aparença normal, 2: dipòsit d'A β al voltant de tot el vas, 3: 50% de desdoblament de la paret del vas, conegut com vas dins de vas, 4: paret engruixida degut a necrosi fibrinoide amb infiltrat eosinofílic i disrupció de l'estructura vascular (48,49). A nivell de recerca, s'ha fet una escala simplificada de 3 nivells: lleu, moderat i sever (9) (Figura 4).

L'evolució fisiopatològica de l'AAC en un vas comença amb el dipòsit d'A β a la túnica mitja, rodejant les cèl·lules del múscul llis. Encara que ja hi ha acumulació d'A β , els canvis morfològics del vas són mínims, sent considerada una AAC lleu (Figura 4.A). L'AAC evoluciona cap a una forma de severitat moderada quan les parets dels vasos comencen a estar totalment cobertes per A β i substituint les cèl·lules del múscul llis, podent ocasionalment dipositar-se l'A β també en àrees al voltant del vas (Figura 4.B). Una forma més severa d'AAC es donaria quan hi ha una degeneració de la paret del vas i les úniques cèl·lules que queden sense afectació evident serien les cèl·lules endotelials. En aquests casos, la degeneració del vas es pot veure morfològicament ja que hi ha una deslaminització i la part externa de la túnica mitjana es separa, com si hi hagués un vas dins del vas, fenomen també anomenat vas de doble barrera (Figura 4.C) (9,44). En les formes més severes d'AAC hi ha una pèrdua total del múscul llis, afavorint l'aparició d'aneurismes i necrosi fibrinoide, cosa que debilita el vas i afavoreix la seva ruptura. A les etapes finals de l'AAC també apareix inflamació perivascular amb astròcits i micròglia activada (2,50,51).

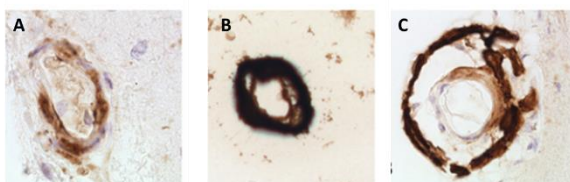


Figura 4. Vasos cerebrals afectats per AAC, tinció immunohistoquímica d'A β . Imatge adaptada de Charidimou 2012 (9). A) vas amb severitat lleu. B) Vas amb severitat moderada. C) Vas amb severitat greu.

En un estudi recent realitzat en teixit d'autòpsies cerebrals humanes s'ha detectat disrupció de la BHE (*leakage* en anglès), observant fibrinogen al parènquima i pèrdua d'actina de cèl·lules del múscul llis, en fases molt primerenques d'AAC en vasos amb grau 1 de Vonsattel, i que això ocorre en el 100% dels vasos que han patit remodelació (grau 3 i 4 de Vonsattel). Alhora, es pot detectar inflamació perivascular en vasos a partir del grau 2 de Vonsattel i de manera molt consistent en vasos amb grau 4 (52). De fet, se sap que en casos on hi ha disrupció de la BHE, el fibrinogen pot penetrar al parènquima i s'ha descrit la presència de fibrinogen en vasos positius d'A β en pacients

amb MA (53). El fibrinogen és el contribuïdor principal de l'hemostàsia o coagulació i deriva a fibrina. En aquest sentit, s'ha proposat que la conversió a fibrina pot induir l'activació de resposta immune, causant inflamació al cervell (54). Tenint en compte tot això, actualment es pensa que la mort de cèl·lules de múscul llis deguda a l'acumulació d'A β porta a una alteració de la disrupció de la BHE que alhora fomenta la inflamació perivascular donant lloc a una remodelació del vas que acaba amb la seva ruptura, causant una HIC o microsagnats cerebrals. Apart, cal recalcar que l'acumulació progressiva d'A β , amb la subseqüent pèrdua de cèl·lules de múscul llis pot portar a una disminució de la vasoactivitat i del propi aclariment d'A β per vies de drenatge perivascular, promovent encara més l'acumulació d'A β i agreujant la severitat de l'AAC (2) (Figura 5).

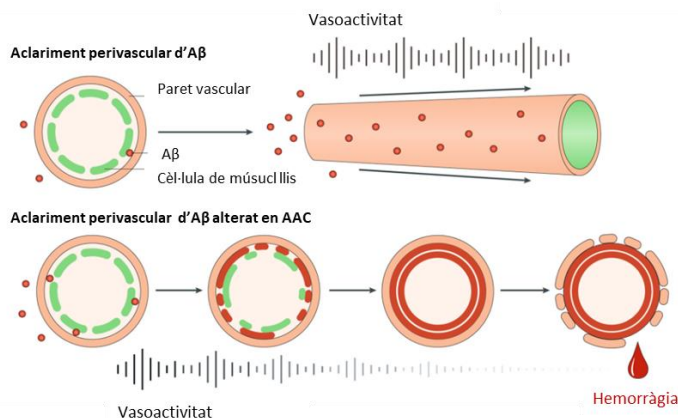


Figura 5. Aclariment perivascular d'A β en condicions fisiològiques i en AAC. L'alteració de l'aclariment perivascular d'A β en AAC pot acabar portant a una major acumulació d'A β amb mort de les cèl·lules de múscul llis i disminució de la vasoactivitat. Finalment l'acumulació excessiva d'A β podria donar lloc al trencament del vas produint una hemorràgia. Imatge adaptada de Greenberg et al. (2).

2.3 Diagnòstic d'AAC

El diagnòstic definitiu de l'AAC només es pot dur a terme per confirmació histopatològica. En la majoria de casos s'ha de fer *post-mortem* a partir d'una necròpsia de teixit cerebral, però ocasionalment es pot fer a través d'una biòpsia cerebral quan s'evacua l'hematoma en un cas agut d'HIC. Actualment, a la pràctica clínica s'utilitzen els anomenats criteris de Boston per fer un diagnòstic clínic no invasiu de la malaltia (55–57). Els criteris de

Boston estan basats en característiques clíniques i radiològiques, i si n'hi ha, d'histopatològiques. Inicialment es va definir un diagnòstic probable d'AAC per pacients majors de 55 anys que presentessin múltiples hemorràgies (o microsagnats cerebrals) específicament lobars, corticals o subcorticals sense cap altra causa que expliqués el motiu de l'HIC (55). Al 2010, Linn et al., van actualitzar els criteris afegint l'avaluació de siderosi superficial cortical (SSc), que consisteix en la presència de residus d'hemosiderina a capes superficials del còrtex i es poden observar per ressonància magnètica nuclear (RMN), creant el criteri de Boston modificat, també conegut com a versió 1.5 (56). Amb aquesta modificació, la sensibilitat de diagnòstic augmentava mentre que l'especificitat no es veia modificada (56). Segons els criteris de Boston, la classificació de l'AAC es pot dividir en 4 categories: AAC possible, AAC probable, AAC probable amb confirmació histopatològica i AAC definitiva. Recentment, al 2022, s'han tornat a actualitzar els criteris de Boston, anomenats versió 2.0, validant-los en diferents cohorts internacionalment i millorant la seva precisió (57). En aquesta nova versió s'ha disminuït l'edat d'inclusió als 50 anys i s'han considerat altres presentacions clíniques de la malaltia, més enllà de la presència d'HIC, tals com el deteriorament cognitiu i l'ocurrència d'episodis neurològics focals transitoris. El paper de la siderosi superficial cortical també ha guanyat importància i s'han introduït altres marcadors radiològics de la substància blanca (hiperintensitats de substància blanca o leucaraiosi, i espais perivasculars dilatats (EPVD) subaracnoidals i en el centrum semiovale (CSO)). Es poden veure els criteris de Boston amb detall a la Taula 1. Amb aquests canvis s'ha aconseguit una millora de la sensibilitat per detectar AAC possible i probable vs. no presentar AAC del 75.5% al 88.2%, tot i que l'especificitat ha baixat del 87.5% al 70%. De totes maneres, aquesta disminució de l'especificitat és normal ja que s'han inclòs més presentacions clíniques sense comprometre la validesa des nous criteris (57).

En casos on no es poden dur a terme els criteris de Boston per falta de mostra histopatològica o de RMN, es pot fer un possible diagnòstic amb tomografia computeritzada (TC) seguint els criteris simplificats d'Edimburg. Els criteris d'Edimburg originals es van descriure el 2018 sent aplicables a persones que havien patit una HIC lobar i s'havien sotmès a una TC i estaven basats en el genotip d'ApoEε4, la presència d'hemorràgies subaracnoidals (HSA) detectades per TC i projeccions *finger-like* (en forma de dits) de l'HIC detectada per TC (58). Recentment s'han validat els criteris simplificats d'Edimurg permetent classificar els pacients que han patit una HIC lobar i

Taula 1. Criteris de Boston v.2.0. Adaptada de Charidimou et al. (57)	
AAC DEFINITIVA	<p>Avaluació <i>post mortem</i> del cervell demostrant:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemorràgia espontània intracerebral, episodis neurològics focals transitoris, hemorràgia a la convexitat subaracnoidal, deteriorament cognitiu o demència. • AAC severa amb vasculopatia. • Absència d'altres diagnòstics.
AAC PROBABLE AMB CONFIRMACIÓ HISTOPATOLÒGICA	<p>Informació clínica i mostra de teixit patològica (hematoma evacuat o biòpsia cortical) demostrant:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemorràgia espontània intracerebral, episodis neurològics focals transitoris, hemorràgia a la convexitat subaracnoidal, deteriorament cognitiu o demència. • Algun grau d'AAC en la mostra histopatològica. • Absència d'altres diagnòstics.
AAC PROBABLE	<p>Per pacients ≥ 50 anys, informació clínica i RMN demostrant:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Absència de lesions hemorràgiques (HIC o microsagnats) profundes en RMN T2* i d'altres causes que expliquin les lesions hemorràgiques. ‡ • A) o B) <p>A)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemorràgia espontània intracerebral, episodis neurològics focals transitoris, hemorràgia a la convexitat subaracnoidal, deteriorament cognitiu o demència. • Com a mínim 2 de les següents lesions hemorràgiques amb localització estrictament lobar observades en RMN T2*: hemorràgia intracerebral, microsagnats cerebrals, focus de siderosi cortical superficial o hemorràgia a la convexitat subaracnoidal. <p>B)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Una hemorràgia lobar més un marcador de substància blanca observat per RMN: espais perivasculars severament dilatats al centrum semiovale, o hiperintensitats de la substància blanca en un patró puntiforme (<i>multispot</i>, en anglès). • Lesions hemorràgiques al cerebel no es compten ni com lobars ni profundes.
AAC POSSIBLE	<p>Per pacients ≥ 50 anys, informació clínica i RMN demostrant:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Absència de lesions hemorràgiques (HIC o microsagnats) profundes en RMN T2* i d'altres causes que expliquin les lesions hemorràgiques. ‡ • A) o B) <p>A)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemorràgia espontània intracerebral, episodis neurològics focals transitoris, hemorràgia a la convexitat subaracnoidal, deteriorament cognitiu o demència. • Una lesió hemorràgica estrictament lobar observada en RMN T2*: hemorràgia intracerebral, microsagnats cerebrals, focus de siderosi cortical superficial o hemorràgia a la convexitat subaracnoidal. <p>B)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Un marcador de substància blanca observat per RMN: espais perivasculars severament dilatats al centrum semiovale, o hiperintensitats de la substància blanca en un patró puntiforme (<i>multispot</i>, en anglès). • Lesions hemorràgiques al cerebel no es compten ni com lobars ni profundes.
<p>‡ Altres causes de lesions hemorràgiques poden ser: antecedent traumàtic al cap, transformació hemorràgica d'un ictus isquèmic, malformació arteriovenosa, tumor hemorràgic, vasculitis del sistema nerviós central. Altres causes de siderosi superficial cortical i hemorràgia de la convexitat subaracnoidal aguda també han de ser excloses.</p>	

s'han sotmès a un TC en les següents categories: risc baix d'AAC: si no presenten projeccions *finger-like* ni HSA; risc mitjà d'AAC: presenten HSA però no projeccions *finger-like* i risc alt d'AAC: presenten HSA i projeccions *finger-like*. En aquest estudi de validació es va obtenir una especificitat del 87.1 % dels pacients classificats com risc alt segons Edimburg, comparant-los amb diagnòstic probable de Boston per RMN, indicant que els criteris d'Edimurg poden ser útils per un diagnòstic clínic permetent classificar als pacients amb HIC lobar amb bastanta precisió (59), tot i que no es tenen en compte altres presentacions clíniques de la malaltia.

Degut a que encara no disposem de criteris prou precisos per tal de detectar l'AAC en etapes primerenques, és una prioritat en el camp trobar noves eines per aconseguir un millor diagnòstic de la malaltia. En aquest sentit, la recerca de noves tècniques de neuroimatge i la combinació de diferents biomarcadors poden tenir un paper clau en els propers anys. Actualment, els biomarcadors més rellevants de l'AAC són els radiològics (hemorràgics i no hemorràgics) detectats per RMN. Però també s'han descrit marcadors biològics i genètics, com s'exposarà en apartats posteriors.

2.4 Tractament de l'AAC

Desafortunadament no disposem en l'actualitat de cap tractament modificador de la malaltia pels pacients amb un diagnòstic clínic d'AAC. En casos de pacients amb sospita d'AAC les úniques mesures a adoptar són preventives amb la intenció de limitar l'impacte que pot haver causat l'HIC i prevenir la seva recurrència, tals com el control de la temperatura i la glucèmia o el maneig de l'hemostàsia.

Les HIC suposen un 10-15% dels casos d'ictus, i la incidència de mortalitat ($\approx 50\%$) i la gravetat de la discapacitat post-ictus hemorràgic són molt més altes que en l'ictus isquèmic, sent de les primeres causes de discapacitat greu (60,61). A nivell de tractament d'HIC, l'objectiu principal és evitar el creixement de l'hemorràgia de forma aguda ja que un major temps entre l'inici dels símptomes i el moment de la detecció de l'HIC per neuroimatge, així com un major volum basal de l'hemorràgia, estan associats a un major creixement de l'hematoma i pitjor pronòstic (62). És per això que és essencial actuar de forma ràpida i eficaç. En casos concrets amb hemorràgies molt extenses es pot fer un tractament quirúrgic (craniotomia o endoscòpia) per realitzar l'evacuació de l'hematoma (63). A més, és extremadament important controlar la pressió arterial de

forma ràpida, administrant tractament antihipertensiu si és necessari (64,65). De fet, disminuir la pressió intraarterial durant les cures intensives està lligat a un millor pronòstic (66,67), . També cal tenir en compte, que si el pacient està prenent anticoagulants en el moment de patir l'HIC s'ha de tractar el pacient amb un antídote per revertir l'efecte anticoagulant de forma aguda (68). Pensant més a llarg termini, hi ha controvèrsia sobre l'ús d'anticoagulants després d'una HIC en pacients amb AAC, degut a la possibilitat que tinguin un major risc de patir un esdeveniment hemorràgic. Però en estudis recents amb anticoagulants de nova generació com Apixabán i antiplaquetaris com Alteplasa no s'ha demostrat que sigui així (69,70). El més recomanat és decidir el tractament de forma individualitzada i en casos on hi hagi risc de patir un ictus isquèmic, com per exemple en pacients amb fibril·lació auricular (FA), sí que es recomana tractar amb anticoagulants de nova generació, també anomenats NOAC (de l'anglès, *Non-vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant*) (69–74). Actualment s'estan duent a terme diferents assajos clínics sobre l'ús d'anticoagulants en pacients que han patit HIC.

Pel que fa a tractaments modificadors de la malaltia, s'estan estudiant diversos enfocaments per poder tractar l'AAC, com per exemple: disminuir la producció d'A β , protegir els vasos de l'efecte tòxic de l'A β , o promoure l'eliminació d'A β a través d'immunoteràpia amb anticossos anti-A β (7). En aquest sentit, l'únic assaig clínic que s'ha arribat a dur a terme en humans estava basat en l'ús de l'anticòs monoclonal anti-A β Ponezumab (PF-04360365, Pfizer, NCT01821118). L'assaig clínic amb Ponezumab va resultar segur, però no va tenir un efecte en la milloria de la reactivitat vascular ni en el número de microhemorràgies dels pacients amb AAC probable segons els criteris de Boston v.1.5 (75). Tot i que l'assaig clínic va resultar negatiu, el fet que l'ús d'immunoteràpia resultés segur en pacients amb AAC és encoratjador per poder seguir provant altres tractaments basats en l'estratègia d'immunoteràpia contra A β .

2.5 Marcadors de l'AAC

2.5.1 Marcadors de neuroimatge de l'AAC

Per tal de detectar una HIC, el procediment principal utilitzat és una exploració per una tomografia computada (TC) cranial en el moment de l'hemorràgia. Això és essencial per detectar l'hemorràgia i descartar un ictus isquèmic. Apart, permet saber la localització de l'hemorràgia, mida, forma i densitat. La forma i densitat de l'hemorràgia estudiades per TC es poden classificar en escales de 5 graus, que es poden dicotomitjar en forma

regular i densitat homogènia (categories 1 i 2) i forma irregular i densitat heterogènia (categories de 3 a 5) (76). Més irregularitat i heterogènia de l'hemorràgia han estat associats amb l'expansió de l'hematoma (77). Aquesta informació és essencial per decidir el maneig clínic del pacient amb HIC.

Per altra banda, existeixen una sèrie de marcadors radiològics detectats per RMN associats a l'AAC. De fet, és important recalcar que l'AAC és un tipus de malaltia de petit vas (*small vessel disease* en anglès), un grup de processos patològics que afecten a artèries petites, vècules i capil·lars cerebrals (78). Per tant, molts dels marcadors radiològics per l'AAC són marcadors típics de petit vas, tant hemorràgics com no hemorràgics. La seva detecció és important per poder classificar els pacients pels criteris de Boston, i poder avaluar la severitat de l'AAC. Dins dels marcadors hemorràgics trobem: microsagnats cerebrals lobars, siderosi superficial cortical (SSc) i hemorràgies subaracnoidals de la convexitat. I dins dels no hemorràgics: hiperintensitats de substància blanca i espais perivasculars dilatats (EPVD) en el centrum semiovale. Tots aquests marcadors radiològics, els més descrits en cohorts de pacients amb AAC, estan representats a la figura 6 (31).

El marcador radiològic de malaltia de petit vas més rellevant per l'AAC és la presència de microsagnats cerebrals amb localització estrictament lobar (56,57). Els microsagnats cerebrals es poden observar com hipointensitats petites rodones i homogènies en la seqüència ponderada T2* i representen àrees microscòpiques de dipòsits d'hemosiderina (79,80). Es creu que el dany a la BHE causat per l'AAC (81–83), podria ser el causant del desenvolupament de les microhemorràgies cerebrals (84–87). Tot i que la rellevància clínica dels microsagnats cerebrals encara no està del tot clara, són molt comuns en l'AAC i s'han associat amb la progressió de l'AAC i amb el risc de recurrència d'HIC (34,88). Apart, els microsagnats cerebrals també han estat associats amb altres símptomes clínics de l'AAC com disfunció cognitiva (89,90) i demència (91). És important recalcar que tot i que els microsagnats cerebrals lobars estan estretament relacionats amb l'AAC, no són específics d'aquesta i es troben entre un 5 i 24% de persones amb edat avançada, tenint un valor diagnòstic limitat (92).

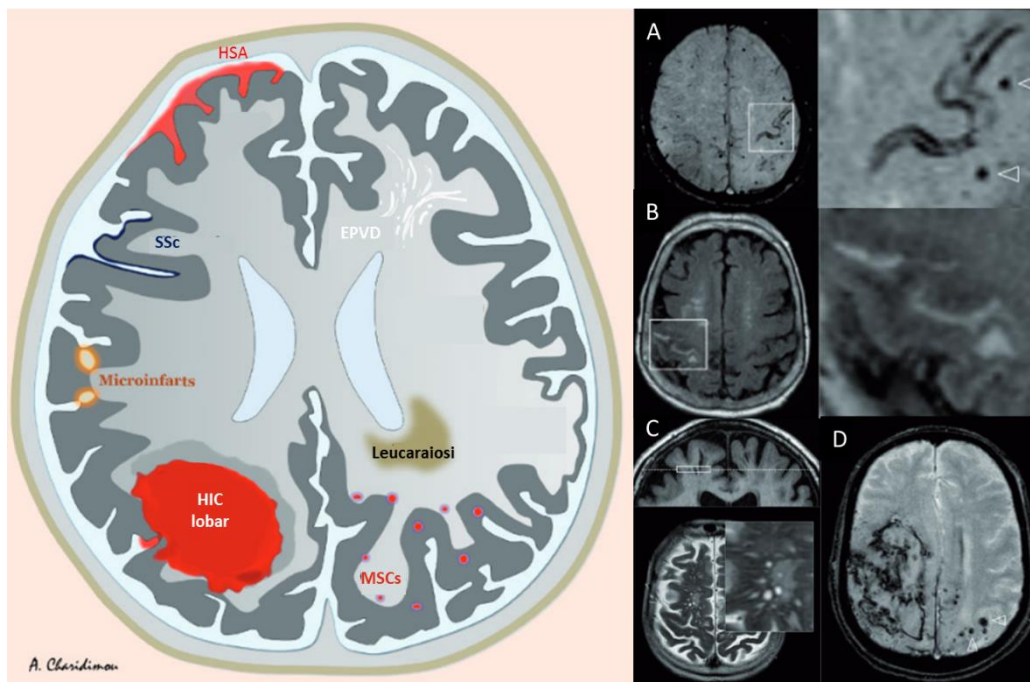


Figura 6. Representació esquemàtica de les principals característiques radiològiques de l'AAC detectades per RM. A la dreta es poden veure exemples de detecció per RMN de A) siderosi i microsagnats corticals, B) hiperintensitat de la substància blanca, en concret en el solc central, C) EPVDs i D) HIC a la zona parietal. HSA: hemorràgia subaracnoidal de la convexitat. SSc: siderosi superficial cortical. MSCs: microsagnats cerebrals EPVD: espais perivasculars dilatats. Imatge adaptada de Charidimou 2017 (31).

Un altre marcador radiològic hemorràgic per l'AAC és la siderosi superficial cortical (SSc), que és definida com el dipòsit d'hemosiderina en capes subpials del còrtex cerebral (93). Els mecanismes fisiopatològics que causen la SSc encara estan en estudi però es creu que la siderosi és una conseqüència d'esdeveniments hemorràgics crònics a les leptomeninges (94). La SSc també és un marcador comú en pacients d'AAC trobant-se fins a un 60% dels casos (56). A més, el sol fet d'afegir aquest marcador en els primers criteris de Boston ja va aconseguir augmentar la seva sensibilitat (56). Apart de ser útil per poder classificar els pacients d'AAC pels criteris de Boston, la SSc també s'associa a risc hemorràgic en pacients amb sospita d'AAC (95,96). En aquest sentit, també estan associades amb l'AAC les hemorràgies subaracnoidals de la convexitat, sent molt útils pel diagnòstic amb TC segons els criteris simplificats d'Edimburg (59,88). De fet, es considera que la SSc seria el resultat dels residus d'una hemorràgia subaracnoidal de la convexitat aguda (97).

Per altra banda, les lesions no hemorràgiques de la substància blanca, anomenades leucaroiosi, es poden detectar com hiperintensitats de la substància blanca en seqüències de RMN T2 o FLAIR (recuperació d'inversió atenuada per fluids, de l'anglès, *Fluid-Attenuated Inversion Recovery*). Les hiperintensitats de substància blanca estan relacionades a edat avançada però es troben de manera molt més freqüent en pacients amb AAC (98), i aquests presenten hiperintensitats més severes que controls sans o pacients amb MA (88). A més, les hiperintensitats de substància blanca, considerades marcadors de malalties de petit vas cerebral, estan relacionades amb deteriorament cognitiu (99,100). Tot i que la fisiopatologia darrere de les hiperintensitats de substància blanca encara no es coneix del tot, es creu que corresponen a àrees de desmielinització amb pèrdua axonal i activació de la microglia (101). S'ha suggerit que en el cas de la β -amiloïdosi cerebral, com les hiperintensitats de substància blanca estan relacionades amb la càrrega amiloïdogènica cerebral, podrien ser degudes a una disrupció de la BHE com a conseqüència dels dipòsits d'A β (102). Cal destacar que les hiperintensitats de substància blanca s'han afegit recentment a la última versió dels criteris de Boston 2.0 (57).

Per últim, trobem els espais perivasculars dilatats (EPVD), també anomenats espais de Virchow-Robin, com a marcadors de neuroimatge associats a l'AAC. Els EPVD es poden detectar com hiperintensitats en RMN ponderada en T2. La dilatació dels EPV és un reflex de l'acumulació de fluid intersticial, i està relacionada amb alteracions de la BHE i inflamació cerebral (103). De fet, s'ha vist que l'AAC s'associa específicament a la presència d'EPVS a la substància blanca del centrum semiovale (CSO), tenint una prevalença molt més alta en aquesta regió en pacients que han patit una HIC atribuïda a AAC que en pacients amb HIC atribuïdes a altres etiologies (104). Assenyalar per altra banda que també s'han detectat EPVD al CSO en pacients amb MA (105). De fet, en estudis histopatològics *post-mortem*, s'ha observat que els EPVD en el CSO estan relacionats amb la càrrega amiloide tant en pacients d'AAC com de MA (106–108). El fet que apareguin EPVD en l'AAC i que aquests estiguin associats als dipòsits d'A β , suggereix que aquesta dilatació vascular podria ser la conseqüència d'un deteriorament del drenatge perivascular d'A β . En més detall, un deteriorament del drenatge perivascular d'A β portaria a una acumulació del material amiloide a les artèries corticals, causant una alteració del flux que resultaria en un estancament de líquid intersticial als EPV en àrees més profundes, concretament a la substància blanca prop del còrtex, o

sigui, al CSO. Aquesta acumulació de líquid acabaria resultant en una dilatació dels EPV d'aquesta zona (108–110). De fet, els EPVD al CSO estan guanyant molta rellevància clínica recentment i s'han inclòs en els criteris de Boston actualitzats 2.0, millorant la sensibilitat de predicció diagnòstica de l'AAC (57,111).

Tots aquests marcadors radiològics són essencials per poder classificar els possibles pacients d'AAC. Però apart del diagnòstic, també es poden utilitzar per predir la severitat de l'afectació vascular d'aquests pacients. En aquest sentit, una escala creada al 2016 per Charidimou et al., permet categoritzar el grau patològic de l'AAC com a malaltia de petit vas (112). Aquesta escala va de 0 a 6 graus, sent 6 una major severitat. Està basada en l'ús dels biomarcadors radiològics que hem exposat: microsagnats cerebrals, SSc, EPVD al CSO i hiperintensitats de substància blanca; i s'anomena CAA-SVDB (de l'anglès, *cerebral amyloid angiopathy - small vessel disease burden*) (112). Aquesta escala ha estat validada en una cohort de pacients amb AAC, on es va comprovar que s'associava de manera independent a l'afectació vascular de la malaltia, així com a la recurrència d'HIC lobar simptomàtica (96). L'ús d'aquesta escala pot ser molt important per determinar el valor predictiu de futurs biomarcadors, i fins i tot es podria utilitzar pel monitoratge d'assajos clínics.

Finalment, un altre marcador d'imatge associat a l'AAC és l'atròfia cerebral. Tot i que no és un marcador específic de l'AAC i està associat a altres patologies com la MA, s'ha demostrat que pacients amb AAC presenten atròfia cerebral de manera independent de la MA i que aquesta s'associa a una pitjor funció executiva dels pacients (2,113).

Apart de marcadors de RMN, en els últims anys s'han desenvolupat radiotraçadors d'A β per tomografia per emissió de positrons (PET, de l'anglès, *positron emission tomography*) (114,115) per tal d'intentar detectar els nivells d'A β cerebral en vida. Alguns dels radiotraçadors estudiats capaços d'unir-se a l'A β fibril·lar, i així detectar-la, són el [11C]-Pittsburgh Compound B (PiB) o el [18F]-Florbetapir (116–118). De fet, el PiB-PET és capaç de distingir entre HIC d'origen hipertensiu amb HICs relacionades amb l'AAC (116). Tot i així, aquestes tècniques d'imatge encara no són prou específiques com per poder fer un diagnòstic diferencial entre l'AAC i la MA, ja que no són capaces de diferenciar l'A β vascular del parenquimatós (114,119). De fet, en un article recent, no s'ha trobat cap associació entre els nivells de retenció de PiB cortical i la presència d'AAC observada histopatològicament, mentre que sí que s'associava als nivells de plaques A β

(120), posant en dubte la possible unió d'aquests radiotraçadors d'amiloide als dipòsits estrictament vasculars en pacients d'AAC asimptomàtica. Amb tot això, la necessitat de trobar un radiotraçador específic d'AAC segueix sent una prioritat. S'han descrit 2 compostos que s'uneixen preferentment a l'A β vascular *in vivo* en models de ratolí, un anàleg de la resorufina (121) i un anàleg del Congo red (122), compostos que s'utilitzen per detectar l'A β en histopatologia. De totes maneres, aquests compostos només s'han descrit en un estudi cadascun i s'haurien d'estudiar en més profunditat en altres models animals i en humans.

2.5.2 Marcadors bioquímics d'AAC

Una bona opció per estudiar la malaltia seria l'ús de marcadors bioquímics que es puguin detectar i mesurar en fluids perifèrics com ara plasma/sèrum o líquid cefalorraquidi (LCR), tot i que actualment no n'hi ha cap que es pugui utilitzar pel diagnòstic de l'AAC. L'ús de biomarcadors per aconseguir un diagnòstic més precís i diferencial és essencial per tal de poder monitoritzar futurs tractaments per l'AAC en assajos clínics. A més, seria molt interessant tenir marcadors per fer un seguiment de la malaltia per tal de poder predir el pronòstic dels pacients que han patit una HIC associada a AAC, sobretot pel que fa a recurrència d'HIC i l'aparició de deteriorament cognitiu.

Els biomarcadors més descrits i validats per l'AAC són A β ₄₀ i A β ₄₂, que es troben disminuïts al LCR respecte controls sans (123). Concretament, els nivells d'A β ₄₂ es troben disminuït al LCR tant de pacients amb MA com AAC; mentre que els nivells d'A β ₄₀ estan específicament reduïts en pacients amb AAC en comparació amb pacients de MA i controls sans (124–128). A més, recentment s'ha descrit que els pacients amb AAC presenten un perfil de biomarcadors específic al LCR on apart d'A β ₄₂ i A β ₄₀, altres pèptids d'A β com A β ₃₈, i sAPP β estan específicament reduïts, cosa que no succeeix en pacients amb MA (123). A més, els nivells totals de tau i tau fosforilada al LCR de pacients amb AAC son inferiors que en pacients amb MA però per sobre de controls (124,126). Apart de les proteïnes típiques de la fisiopatologia de la β -amiloïdosi, recentment s'estan proposant altres biomarcadors que es poden detectar en LCR. Un estudi recent va proposar menors nivells d'apolipoproteïna D al LCR com a potencial biomarcador per l'AAC (129). També s'han descrit nivells elevats al LCR de pacients d'AAC de l'activador del plasminogen tipus uroquinasa (uPA) (130). A més, el nostre grup va descriure recentment una reducció dels nivells de lactaderina o MFGE-8 (de l'anglès, *Milk fat*

globule-EGF factor 8 protein) al LCR de pacients d'AAC, també comparant-los amb pacients de MA i controls sans (131). Sorprenentment, els nivells de PDGFR β (de l'anglès, *platelet-derived growth factor receptor- β*) que s'ha proposat com a marcador de disrupció de la BHE, no s'han vist alterats en pacients amb AAC (132). En un altre estudi publicat el 2021, van observar que el LCR de pacients amb AAC tenia alteracions metal·lòmiques, amb nivells més elevats de ferro, ferritina, níquel i cobalt en pacients d'AAC respecte mostres de pacients de MA (133). Tot i que aquests estudis són molt prometedors, cal recalcar que l'ús de LCR com a biomarcador és complicat degut a que l'obtenció de LCR és una tècnica invasiva i amb poca accessibilitat per poder fer investigació. En aquest sentit, l'ús de marcadors en sang suposaria un gran avenç a nivell de la pràctica clínica. Tot i que encara no s'han descrit biomarcadors en plasma que puguin diferenciar o predir l'AAC, diferents grups d'investigació estan treballant actualment en aquesta direcció. Els resultats referents a nivells d'A β ₄₀ i A β ₄₂ en plasma de pacients d'AAC són diversos i no es repliquen en diferents grups (134,135), tot i que darrerament sembla que es confirma que nivells plasmàtics d'A β ₄₀ detectats amb mètodes d'alta sensibilitat estan elevats en pacients que presenten AAC segons els criteris modificats de Boston, respecte una cohort de controls sans i amb MA (136). En general, hi ha pocs estudis sobre possibles biomarcadors per a l'AAC en fluids perifèrics, i els que hi ha estan basats en un número limitat de casos. Més estudis validant aquestes troballes en cohorts de pacients més grans a nivell multicèntric segueixen sent necessaris per poder considerar possibles nous biomarcadors.

2.5.3 Factors genètics associats a l'AAC

Tot i que és poc freqüent, hi ha diverses formes familiars d'AAC que presenten un patró hereditari autosòmic i poden estar causades per diferents mutacions. Les formes familiars solen desenvolupar-se a una edat més primerenca (<55 anys) i presentar una simptomatologia més severa (7,137). La majoria de formes d'AAC familiar són degudes a mutacions al gen que codifica per la PPA, sent la més descrita la mutació holandesa (E693Q) que genera una major acumulació d'A β a la cerebrovasculatura i els símptomes clínics principals són HICs lobars recurrents i demència d'inici primerenc (138,139). Altres mutacions al gen PPA que causen AAC familiar són la mutació italiana (E693K), l'àrtica (E693G), la flamenca (A692G) i la de Iowa (D694N) tenint com a simptomatologia principal HICs lobars (140–143). Apart, mutacions que causen MA familiar als gens de la PS1 i PS2, també afavoreixen l'aparició d'AAC (144,145).

La descoberta genètica més important pel que fa a l'AAC esporàdica és l'associació de la patologia amb els polimorfismes del gen APOE, l' APOE ϵ 4 i APOE ϵ 2 (44,146). La presència d'APOE ϵ 4 es considera el major factor de risc per l'AAC esporàdica (147), sent també un factor de risc per l'AAC de tipus 1 o capil·lar (7,147). A més, APOE ϵ 4 està específicament associada a HICs i microsagnats amb localització lobar i no en zones profundes del cervell, trets característics de l'AAC (148,149). El polimorfisme APOE ϵ 2, tot i que no està específicament associat amb més severitat de l'amiloïdosi com a tal, sí que s'associa a canvis vasculars més severos i a la presència i recurrència d'HIC deguda a l'AAC (150). En aquest sentit, en un estudi previ del nostre grup vam observar que pacients amb confirmació patològica d'AAC que havien patit una HIC eren portadors d'APOE ϵ 2 més freqüentment que pacients amb AAC sense HIC (151) validant resultats observats prèviament (152). A més, en aquest estudi vam observar que el genotip APOE ϵ 4 estava més representat en pacients amb AAC tipus 1, mentre que l'APOE ϵ 2 es trobava de forma més freqüent en pacients amb AAC tipus 2 (151), confirmant també estudis anteriors (29,46).

Un tipus de variant genètica molt estudiada són els polimorfismes de nucleòtids simples (SNPs, de l'anglès, *single nucleotide polymorphisms*) que consisteixen en variacions genètiques d'un sol nucleòtid pertanyents a un gen. Per tal de poder-se considerar com a SNP, cal que es trobin almenys en un 1% de la població. Aquesta mutació d'un sol nucleòtid sol referir-se com a al·lel minoritari i pot tenir un efecte protector, de risc o no tenir efecte en diferents patologies i processos fisiològics. La nomenclatura associada als SNPs és l'identificador (rs + un número) més l'al·lel minoritari en parèntesi (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)). En aquest sentit, apart d'APOE, s'han descrit altres gens associats amb l'AAC esporàdica. Un SNP del gen del receptor del complement 1 (CR1, de l'anglès, *complement receptor 1*) s'ha associat a una major severitat vascular d'acumulació d'A β , observada histopatològicament, així com a un major risc i recurrència d'HIC associada a l'AAC (153). En aquest sentit, SNPsen el gen que codifica per l'enzim convertidora de angiotensina (ACE, de l'anglès, *angiotensin-converting enzyme*) també s'han associat a recurrència d'HIC associada a l'AAC (154). A nivell histopatològic, un estudi de Mäkelä et al. (2018) va descriure com diferents mutacions esporàdiques en els gens CASS4, CLU i ZCWPW1 s'associaven amb la presència d'AAC i en els gens TREM2 i HLA-DRB5 amb la presència d'AAC capil·lar en una cohort de MA (155) Per altra banda, el nostre grup prèviament va realitzar un estudi

sobre SNPs del gen CLU que codifica per l'ApoJ en una cohort amb AAC. En aquest estudi, vam observar que els SNPs de CLU rs11136000, rs1532278 i rs7012010 estaven associats a hiperintensitats de substància blanca, i dos d'aquests SNPs (rs11136000 i rs1532278) a microsagnats corticals en una cohort amb sospita clínica d'AAC possible o probable segons els criteris de Boston 1.5 (156).

Per finalitzar, les persones amb Síndrome de Down també solen desenvolupar AAC, amb la majoria de pacients sent positius per AAC als 50 anys en estudis histopatològics, i alguns d'ells desenvolupant HIC associades a l'AAC (157,158). Explicarem més detalls sobre l'afectació de la Síndrome de Down en la β -amiloïdosi cerebral més endavant.

3. Malaltia d'Alzheimer (MA)

3.1 Aspectes clínics de la MA

La MA és la causa més comuna de demència en la població anciana a nivell mundial (159,160). Es caracteritza per ser un procés neurodegeneratiu progressiu del sistema nerviós central. La simptomatologia principal és un declivi de la funció cognitiva i funcional que acaba resultant en la mort del pacient (161). La disfunció cognitiva es presenta amb alteracions a la memòria, conducta, comprensió, llenguatge i raonament (31,162). El principal factor de risc és l'edat, havent-hi una prevalença del 17% en poblacions de 80 a 84 anys i fins al 30% en poblacions majors de 90 anys (162,163). Apart, la prevalença de la MA és major en dones que en homes (163). Altres factors de risc associats a la malaltia de l'Alzheimer són diabetis de tipus 2, dislipèmia, obesitat, malalties cardiovasculars i fumar, entre d'altres (160). Donat que l'esperança de vida està augmentant, s'espera que la prevalença de l'Alzheimer sigui cada cop més elevada, estimant-se que es dupliqui pel 2040 en comparació amb la del 2011, generant grans costos socials i econòmics (162,164).

La MA es classifica en 3 etapes d'evolució: una etapa preclínica asimptomàtica que dura entre 15 i 20 anys, una etapa amb l'inici dels símptomes presentant-se com deteriorament cognitiu lleu, i una fase final de demència amb simptomatologia més severa que sol durar uns 7-10 anys fins la mort del pacient (165). Inicialment els símptomes de deteriorament cognitiu es caracteritzen per una pèrdua de memòria a curt termini que va progressant a alteracions del llenguatge i afectacions a funcions

executives. A partir de l'etapa intermèdia és comú patir símptomes neuropsiquiàtrics com l'apatia, aïllament social i psicosi. En etapes més tardanes de la malaltia també apareixen alteracions en la memòria remota. Tota la simptomatologia comentada va empitjorant fins a arribar a la dependència total del pacient (161,166).

3.2 Fisiopatologia de la MA

En el cervell dels pacients de MA es troba una acumulació d'A β al parènquima formant plaques neurítiques extracel·lulars, alhora que cabdells neurofibril·lars. Aquests trets patològics acaben portant a una pèrdua sinàptica, activació de micròglia i astròcits i finalment una pèrdua neuronal progressiva (165,167). La hipòtesi més acceptada sobre l'inici patològic de la MA és la hipòtesi de la cascada amiloide, que descriu com el dipòsit d'A β és el primer que ocorre i el principal detonant de la MA. Aquesta hipòtesi està fonamentada en el fet que la alteració en gens que codifiquen per proteïnes que intervenen en la producció d'A β , com el PPA o PSEN1/2, causen l'aparició de MA en edats molt primerenques en casos familiars o en el Síndrome de Down (168,169). De fet, s'ha descrit que l'A β comença a dipositar-se en cervell fins a 15-20 anys abans de l'inici de la simptomatologia de la MA (165). Tot i així, l'acumulació d'A β no correlaciona completament amb els símptomes cognitius i de neurodegeneració, que correlacionen millor amb els cabdells neurofibril·lars de tau (170–172). En aquest sentit, la hipòtesi de cascada amiloide està sent contínuament revisada, proposant-se que l'A β , tau, i altres mecanismes fisiopatològics, com la inflamació, interactuen entre ells desenvolupant la MA (173).

Igual que en el cas de l'AAC, en la MA hi ha una acumulació de pèptids A β que és deguda a un desequilibri entre la seva producció i eliminació. Les plaques neurítiques estan composades d'agregats d'A β extracel·lulars i insolubles, sent l'A β_{42} el component majoritari. Hi ha dos tipus principals de plaques en la MA, les plaques difuses i les plaques neurítiques que es poden observar a nivell histològic. Les plaques difuses consisteixen en acumulació d'A β en forma esfèrica però sense presentar un nucli dens ni activació de micròglia i astròcits. Mentre que les plaques neurítiques sí que presenten un nucli molt dens i compacte d'A β amb una espècie d'*halo* clar al seu voltant format per neurites distròfiques positives per tau fosforilada (174,175) i rodejades d'astròcits i micròglia activada (161). La presència de plaques neurítiques es va estenent seguint un patró regional definit per Thal et al (176). De manera resumida, les plaques neurítiques

comencen a dipositar-se al neocòrtex. Seguidament, s'estenen cap a l'hipocamp i còrtex entorrinal. En la següent fase, apareixen plaques també a l'estriat i finalment, podrien arribar al tronc de l'encèfal, tàlem i cerebel (176). A mesura que la malaltia avança, els cervells presenten pèrdua de la densitat sinàptica amb engrandiment dels ventricles i atròfia cortical que s'associa clínicament al deteriorament cognitiu (177,178).

L'altra característica histopatològica determinant de la malaltia d'Alzheimer són els cabdells neurofibril·lars. Aquests són uns agregats intracel·lulars de la proteïna tau hiperfosforilada insoluble que formen uns filaments helicoidals, visualment semblants a cabdells. En la MA aquests cabdells es solen trobar a l'interior de neurones piramidals del còrtex i hipocamp i es solen detectar en etapes posteriors que les plaques neurítiques (165,179). En condicions fisiològiques la proteïna tau és una proteïna que promou la polimerització dels microtúbuls, mantenint la integritat cel·lular, transport axonal, senyalització cel·lular i les sinapsis. La fosforilació de tau és un procés fisiològic, aquest procés esdevé patològic quan hi ha una fosforilació excessiva, portant a una hiperfosforilació de la proteïna que la converteix en insoluble i promou la seva agregació (180,181). A més, tau hiperfosforilada és incapaç de fer la seva funció, dificultant l'acoblament dels microtúbuls i fent-los més inestables. Això altera el transport axonal, així com la senyalització cel·lular i les sinapsis, portant finalment a una disfunció i mort neuronal (165,182). En la MA, hi ha una extensió dels cabdells neurofibril·lars de tau per les diferents zones del cervell seguint un mateix patró. Les etapes d'aquests procés van ser definides per Braak et al., al 1995 (183) i en són 6: a l'inici de la patologia, en les etapes I i II hi ha alteracions en la regió transentorrinal, seguidament progressa a les etapes III-IV on hi ha una afectació severa de les regions entorrinal, transentorrinal i hipocamp; i finalment en les etapes V i VI s'arriba a una alteració neocortical (183).

3.3 Diagnòstic de la MA

Pel diagnòstic de la MA s'utilitzen les guies del NIA-AA (de l'anglès, *National Institute of Aging and Alzheimer's Association*) per un diagnòstic clínic (NIA-AA 2011, (184)) i per un diagnòstic neuropatològic o definitiu (NIA-AA 2012, (185)). A nivell clínic, el diagnòstic de demència probablement deguda a la MA es basa en la presència de deteriorament funcional, perfil clínic amnèsic i dèficit cognitiu, que s'avaluen mitjançant la memòria, l'aprenentatge i les funcions executives i visuals (161,184,186). Igual que en l'AAC, per fer el diagnòstic definitiu és necessari un examen histopatològic de teixit cerebral, que

es fa de manera *post-mortem* seguint els criteris ABC descrits a les guies NIA-AA 2012 (185). Aquests criteris estan basats en 3 escales: la primera (A) les fases de Thal que graduen la distribució anatòmica de les plaques A β (176), la segona (B) els estadis de Braak que graduen la distribució dels dipòsits de tau fosforilada (187), i la tercera (C) l'escala CERAD (de l'anglès, *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) que gradua la densitat de plaques neurítiques, essent una avaluació semi-quantitativa de les plaques neurítiques en el còrtex frontal parietal i temporal a 100x augments (188). A partir d'aquests 3 sistemes de graduació s'obté una puntuació que classifica la probabilitat d'haver patit MA com a baixa, mitjana o alta (185).

3.4 Tractament de la MA

Actualment no hi ha cap fàrmac que reverteixi la malaltia de l'Alzheimer, però sí que hi ha fàrmacs que pretenen modular l'acció dels neurotransmissors acetilcolina i glutamat, implicats en processos de memòria i aprenentatge, per tal de poder alenir els símptomes de la malaltia. Aquests fàrmacs serien el Donezepil, la Rivastigmina i la Galantamina, que són inhibidors de l'acetilcolinesterasa, i la Memantina, antagonista del receptor N-metil-D-aspartat (189). Actualment, la recerca pel que fa a tractaments de MA està enfocada en dianes terapèutiques que aconseguixin modificar o revertir la malaltia. Hi ha diferents enfocaments que s'estan estudiant: inhibidors de γ - i β -secreteases (190) i d'hiperactivitat neuronal, així com la immunització, tant passiva (anticossos contra diferents fragments d'A β i tau) com activa (vacunes contra A β) (191–193). Apart dels tractaments farmacològics, també estan en estudi tractaments basats en la neuroestimulació en àrees específiques del cervell afectades per la patologia (194).

Els estudis que estan més avançats i tenen més interès actualment es basen sobretot en la immunització passiva, amb anticossos contra diferents formes d'agregats d'A β , els quals s'ha demostrat que activen la resposta immunològica i disminueixen la càrrega amiloide al cervell, la neuroinflamació i promouen fins i tot una millora cognitiva (191,195–197). Al 2021, la FDA (en anglès, *Food and Drug Administration*) va aprovar el primer fàrmac modulador de la MA, l'Aducanumab (amb nom comercial d'Aduhelm, Biogen/Eisai), que és un anticòs monoclonal contra A β (191,195,197). Tot i així, es va descriure que aquest fàrmac tenia una eficàcia limitada i al 2022 l'EMA (de l'anglès, *European Medicines Agency*) va rebutjar l'aprovació d'Aducanumab pel seu ús a Europa, argumentant que no hi ha prou proves científiques que indiquin que seria un bon

tractament per la MA. Actualment s'estan reclutant pacients per fer un altre assaig clínic amb Aducanumab en participants amb MA primerenca (NCT05310071). Recentment, al novembre del 2022 s'ha acabat la fase III de l'assaig clínic amb Lecanemab (amb nom comercial Leqembi, Biogen/Eisai), un anticòs monoclonal contra protofibril·les d'A β i al gener del 2023 la FDA n'ha aprovat el seu ús als Estats Units. L'estudi ha demostrat un alentiment del deteriorament cognitiu de manera moderada però significatiu estadísticament (198). En els assaigs clínics duts a terme fins al moment, una de les preocupacions relacionades amb la immunitat passiva són les anomalies que es detecten en la RMN en els cervells de pacients que han rebut els anticossos contra A β , les anomenades ARIA (de l'anglès, *amyloid-related imaging abnormalities*). Aquestes es poden presentar de dues formes: acompanyades d'edema (ARIA-E) o de microhemorràgies i SSc (ARIA-H). S'ha observat que l'aparició de les ARIA són dosi-dependents i que podrien ser degudes a la mobilització de l'A β des del parènquima als vasos sanguinis cerebrals (199–201). Cal destacar que no s'ha demostrat que les ARIA siguin simptomàtiques, i de fet, en molts casos són transitòries. De totes maneres, segueix sent prevalent la preocupació sobre els possibles danys cerebrovasculars causats per aquest tipus de tractament en la MA, els quals podrien indirectament causar un augment de l'AAC, la inflamació perivascular i el deteriorament de l'aclariment perivascular (2).

3.5 Marcadors de MA

Actualment disposem de biomarcadors que poden aportar informació sobre el punt en què es troba la malaltia i ser utilitzats com a suport al diagnòstic. Aquests marcadors poden ser de neuroimatge o bioquímics. Per altra banda també hi ha factors genètics associats a la MA

3.5.1 Marcadors de neuroimatge de la MA

El marcador de neuroimatge més acceptat per la malaltia de l'Alzheimer és el FDG-PET que representa l'activitat neuronal local. En el cas de malalties neurodegeneratives, es veu una disminució de la senyal de FDG-PET cerebral, indicant una pèrdua de funció neuronal. A més, aquesta disminució de senyal segueix patrons diferents segons la malaltia, sent diferencial en el cas de la MA amb un hipometabolisme temporoparietal i utilitzant-se com una prova de suport diagnòstic (202–205). Un altre marcador de neuroimatge per estudiar el dany neuronal és l'atròfia hipocampal i parietal observada a

través de RMN (161,205). A més, els cervells dels pacients amb MA també presenten atròfia cortical amb dilatació i engrandiment dels ventricles, i una disminució del volum que es pot detectar per RMN (205). Per altra banda, els pacients de MA solen patir malaltia cerebrovascular així que també es comú trobar microinfarts corticals, infarts lacunars en els ganglis basals i desmielinització de la substància blanca periventricular (206).

Tot i que no s'utilitzen de forma rutinària, els PET d'amiloide permeten confirmar la presència d'amiloide fibril·lar al cervell. Com hem comentat prèviament hi ha diferents radiotracadors capaços de detectar A β fibril·lar, tals com Amyvid (¹⁸F-Flobetapir), Neuraceq (¹⁸F-Floretaben) i Vizamyl (¹⁸F-Flutemetamol)) aprovats per la FDA i l'EMA (205). De totes maneres, aquests tests serveixen per descartar un diagnòstic de MA en cas que siguin negatius, però no es poden utilitzar per confirmar un diagnòstic de MA. Un altre marcador de neuroimatge que està guanyant molta rellevància els últims anys consisteix en PET de tau, i la FDA va aprovar al 2020 el radiotracador Tauvid (¹⁸F-flortaucipir) per detectar la presència de patologia de tau en pacients amb sospita de MA (207,208).

3.5.2 Marcadors bioquímics de la MA

Pel que fa a biomarcadors bioquímics en el camp de la MA els marcadors clau descrits fins ara es troben al LCR. En concret, nivells disminuïts d'A β ₄₂ (fins a un 50%) i elevats de tau hiperfosforilada (duplicats) i de tau total són els marcadors més acceptats per un diagnòstic diferencial de MA (161,209). Més recentment, s'estan estudiant altres biomarcadors en LCR que semblen que també tindrien un valor predictiu per la MA, tals com altres fragments d'A β , tau fosforilada (p-tau) en diferents residus (p-tau₂₁₇, p-231, p-tau₁₈₁), i altres proteïnes relacionades amb dany neuronal i disfunció vascular (210), com per exemple VILIP-1 (de l'anglès, Visinin like protein 1) (211), SNAP-25 (de l'anglès, Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa) (212), SYT-1 (Sinaptotagmina-1, de l'anglès, synaptotagmin-1) (213,214), GAP-43 (de l'anglès, Growth Associated Protein 43) (215), β -sinucleïna (216) i NGRN (neurogranina) (217).

A part dels marcadors en LCR més estandarditzats, durant els últims anys hi ha hagut un gran interès en l'estudi de biomarcadors en sang específics de MA. Aquests estudis han donat lloc a resultats molt prometedors, els quals han descrit com la ràtio A β _{42/40} al

plasma està disminuïda en pacients amb MA, i de fet, combinada amb edat i genotip APOE ϵ 4 és capaç de fer un bon diagnòstic de la MA (218,219). A més, també hi ha molts estudis que associen els nivells plasmàtics de diferents molècules en sang amb la MA (210,220), com per exemple: tau total, tau fosforilada en diferents residus (p-tau217, p-tau181) (221,222) i la ràtio del pèptid de la PPA APP(669-711)/A β ₄₂ (223). També hi ha marcadors en sang associats amb malalties del sistema nerviós central, que tot i que no ser específics per la MA, es veuen alterats en aquesta (210,220), com NfL (de l'anglès, *neurofilament light chain*) associat a neurodegeneració (224) i GFAP (proteïna àcida fibril·lar glial) associada a dany astrocític (225). Altres marcadors que estan guanyant importància són marcadors de neuroinflamació com YKL-40 també anomenada CHI3L1 (de l'anglès, *Chitinase-3-like protein 1*), sTREM2 (de l'anglès, *soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) i MCP-1 (proteïna quimiotàctica de monòcits), que es troben augmentats tant en plasma com en LCR de pacients amb MA (210). També hi ha molts estudis sobre microRNA (miRNA) en sang així com el contingut de vesícules extracel·lulars com exosomes, però aquests estudis encara són molt primerencs i segueixen sent necessaris protocols per homogeneïtzar els resultats (220). La investigació sobre biomarcadors per la MA està en constant evolució, generant moltes esperances en la millora del diagnòstic de manera no invasiva en un futur proper.

En resum, podem dir que diferents biomarcadors ens permeten detectar la presència de MA en fases preclíniques (Figura 7). Així, en els primers estadis de la malaltia es poden detectar canvis dels nivells d'A β en el LCR, seguit de positivitat per PET d'amiloide (186,226). Seguidament es pot detectar un augment de tau hiperfosforilada al LCR, seguit de marcadors de dany neuronal com fluorodesoxiglucosa (FDG)-PET i atròfia per RMN. Tots aquests marcadors són detectables abans de l'aparició dels símptomes (227). L'ús d'aquests biomarcadors per un diagnòstic precoç d'AD es va proposar al 2018 per Jack et al., on definien l'AD des d'un punt de vista biològic que comença 10-15 anys abans de l'inici dels símptomes (205).

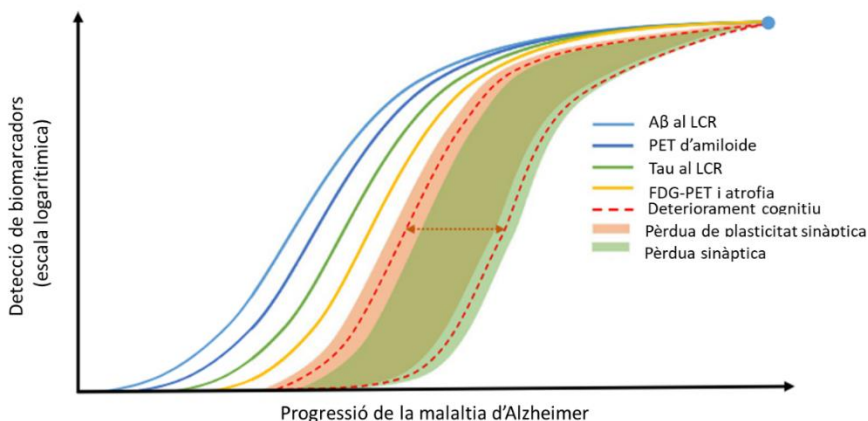


Figura 7. Evolució de la detecció de biomarcadors en la progressió de la malaltia d'Alzheimer. Adaptada de Soria Lopez et al., (161).

3.3.3 Factors genètics associats a la MA

La gran majoria de casos de MA (més del 95%) són esporàdics i ocorren després dels 65 anys, anomenat clínicament malaltia d'Alzheimer d'inici tardà o esporàdica. Però també existeixen casos de MA familiar on la MA és deguda a una mutació genètica hereditària i la seva simptomatologia comença entre els 30 i 50 anys, sent coneguda com malaltia d'Alzheimer d'inici primerenc o familiar. Entre el 5-10% dels pacients afectats per l'Alzheimer familiar tenen mutacions en els gens PPA, PS1 i PS2, involucrats en la producció d'A β (228). Hi ha altres variants genètiques que augmenten el risc de patir MA familiar com en el gen TREM2 expressat per micròglia (229). A més la Síndrome de Down, causada per una trisomia del cromosoma 21 també causa β -amiloidosi cerebral generant MA amb un fenotip molt semblant a l'esporàdica, però a edats més primerenques (169). Això és degut a que el gen que codifica per la PPA es troba al cromosoma 21 i la trisomia causa una sobreexpressió d'aquest gen (169). Les persones amb Síndrome de Down desenvolupen característiques neuropatològiques de MA amb plaques neurítiques i cabdells neurofibril·lars de tau a partir dels 40 anys, quan comencen a desenvolupar també els símptomes de demència, que augmenta de forma exponencial (230,231). El gen APOE, en concret l'al·lel APOE ϵ 4 és el principal factor de risc genètic de la MA esporàdica (161,232) mentre que l'al·lel APOE ϵ 2 es considera protector per la MA, com es discutirà més endavant (233,234).

Per altra banda, s'han dut a terme estudis d'associació genòmica (GWAS, de l'anglès, *genomic wide association study*), per identificar gens relacionats amb la MA. Concretament, els GWAS són un tipus d'estudi genètic observacional on s'estudia l'associació de variants genètiques de tot el genoma amb una condició concreta. A més, de forma general, les variants genètiques estudiades als GWAS solen ser SNPs. En aquesta tesi doctoral ens hem centrat en els resultats d'un estudi GWAS dut a terme per Lambert et al., al 2013 on trobaven una sèrie de SNPs relacionats amb el risc de patir MA (235), i hem estudiat la seva relació en pacients que han patit una HIC lobar amb sospita clínica d'AAC. En aquests GWAS els gens que es van trobar relacionats amb la MA eren: CLU, CR1, ABCA7, PICALM, BIN1, SORL1, PTK2B, EPHA1, CD33, CD2AP, MS4A6A, HLA-DRB4-DRB1, TREM2 i TREML2. Apart, vam afegir el gen TREM1, que també s'ha trobat associat amb la MA en altres estudis (236). Aquests gens s'han associat a la MA per estar implicats en diferents vies: APOE, SORL1, ABCA7 i CLU en metabolisme lipídic; CR1, CD33, MS4A, ABCA7, EPHA1, TREM2, TREM1, TREML2, HLA-DRB5/HLA-DRB1 i CLU en la resposta immunitària; BIN1, CD2AP, PICALM, EPHA1 i SORL1 en endocitosi i PTK2B en sinapsi hipocampal (236,237). Des d'aleshores s'han dut a terme més estudis GWAS que han descrit nous loci associats a la MA (238–240), tot i que encara està en estudi la interpretació d'aquests resultats (241).

4. Models animals de β -amiloïdosi cerebral

Actualment hi ha diversos models animals de β -amiloïdosi cerebral, sent els més utilitzats ratolins transgènics que sobreexpressen gens humans amb mutacions genètiques associades a les formes familiars de MA i AAC. La majoria de línies transgèniques disponibles comercialment són les que sobreexpressen els gens APP (codifica la PPA) i PS1 (codifica la presenilina 1) amb mutacions que afavoreixen un augment de la producció i el dipòsit de l'A β en cervell (242,243).

Cal tenir en compte que no tots els models de β -amiloïdosi cerebral presenten acumulació d'A β de la mateixa forma, havent-hi models específics de MA amb acumulació principalment parenquimatososa, models mixtes de MA i AAC que presenten tant acumulació parenquimatososa com vascular, i models d'AAC que només presenten acumulació d'A β en vasos cerebrals. Un dels únics models de ratolí transgènic que presenta AAC de manera exclusiva és el model APPDutch, que sobreexpressa el gen APP amb la mutació holandesa E693Q (244). És molt rellevant tenir models específics

d'AAC per entendre millor la seva fisiopatologia, així com establir noves eines de diagnòstic i potencials tractaments específics d'AAC. De totes maneres, segueix sent essencial trobar nous models d'AAC ja que aquest model no presenta dipòsits vasculars d'A β fins als 20-25 mesos d'edat, dificultant molt la investigació (244). Altres tipus de models que presenten AAC, tot i que també presenten acumulació parenquimatososa són: Tg-SwDI, APP/PS1, APP/Ld, ArcA β , Tg2576 i APP23 (245–247). De tots aquests models, el model en el que hi ha més estudis pel que fa a la presència de microsagnats cerebrals esporàdics és el model APP23, el qual presenta microsagnats cerebrals al còrtex i tàlem entre els 20 i 28 mesos d'edat (247–249). En aquesta tesi doctoral, s'ha seleccionat aquest model per tal de realitzar un estudi experimental en el context de l'AAC.

El model APP23 sobreexpressa la isoforma APP amb la doble mutació sueca (K670N/M671L) sota el promotor neuronal de ratolí Thy-1 i presenta acumulació d'A β al parènquima i a la vasculatura, sent el primer model descrit d'AAC (250). El dipòsit d'A β en aquest model és progressiu i va augmentant amb l'edat, apareixent primer les plaques neurítiques d'amiloide, sobre els 6-9 mesos d'edat, i l'AAC als vasos leptomenínjics, corticals i de l'hipocamp cap als 12 mesos d'edat (250,251). A diferència de la patologia en els humans, aquest model també presenta acumulació d'A β als vasos del tàlem en edats molts avançades (al voltant dels 2 anys d'edat) (250). És important destacar que s'observa una progressió de l'acumulació d'A β més ràpida i major en femelles que en mascles (252,253). El model APP23 ha estat molt estudiat i se sap que apart de l'acumulació d'A β , també presenta neuroinflamació amb activació d'astròcits i micròglia al voltant de les plaques neurítiques, igual que s'ha descrit en la patologia humana (253,254). Com hem comentat prèviament, aquest model presenta microsagnats cerebrals deguts a l'AAC (247–249). De fet, això està reforçat per un estudi del nostre grup on vam descriure que el model APP23 presentava un nombre elevat de microsagnats cerebrals als 20 mesos d'edat detectats per RMN, a diferència del model transgènic 5xFAD que presenta únicament acumulació d'A β en forma de plaques (252). És de destacar que els ratolins APP23, apart de presentar microsagnats cerebrals al còrtex també en presenten al tàlem (247–249,252). A nivell de cognició i conducta, la línia APP23 presenta dèficits en la memòria espacial a partir dels 3 mesos d'edat que augmenten de manera progressiva amb l'edat (255–258). A més, aquest model presenta dèficits cognitius (tasques d'alternança i aprenentatge invertit), estrès, tigmotaxi (ansietat

en ratolins), fragilitat i més mortalitat en edats avançades que ratolins salvatges (WT, de l'anglès, *wild-type*) (256–258). Finalment, aquest model també és útil per optimitzar tècniques de diagnòstic de l'AAC, podent detectar-se A β amb el lligand PiB a través de PET (259), i presentant nivells reduïts d'A β ₄₂ i augmentats de tau al LCR d'animals d'edat avançada (260).

5. Metabolisme lipídic en β -amiloïdosi cerebral

El metabolisme lipídic és essencial pel sistema nerviós central (SNC), sent el cervell l'òrgan amb major quantitat de colesterol (\approx 25% del colesterol total) del cos humà (261). La major part d'aquest colesterol és colesterol no esterificat que es requereix per la formació de mielina per part dels oligodendròcits, necessària per mantenir una bona funció sinàptica (262). Degut a la BHE, el metabolisme lipídic del cervell està en principi separat del metabolisme lipídic de la perifèria, i el colesterol es sintetitza *de novo* al cervell (263).

5.1 Lipoproteïnes

Les lipoproteïnes són molècules que consisteixen en el conjunt bioquímic compost per lípids i proteïnes anomenades apolipoproteïnes. Les apolipoproteïnes tenen la capacitat d'emulsionar fosfolípids permetent que es formin les lipoproteïnes que són esfèriques amb una capa externa de fosfolípids, colesterol no esterificat i apolipoproteïnes i un nucli hidròfob compost de triglicèrids i colesterol esterificat (264). A més, això permet que els fosfolípids, triglicèrids i colesterol siguin capaços de moure's per un medi aquós, com seria la sang. Hi ha diferents classes de lipoproteïnes, típicament classificades segons la seva densitat que depèn de la seva composició lipídica, tipus d'apolipoproteïnes i mida (264,265). Les principals lipoproteïnes són HDL (de l'anglès, *High Density Lipoprotein*), LDL (de l'anglès, *Low Density Lipoprotein*) i VLDL (de l'anglès, *Very Low Density*). La densitat de les lipoproteïnes és inversament proporcional a la seva mida, ja que com més petites són, més proporció d'apolipoproteïnes tenen (HDL); i com més grans, més proporció de lípids (VLDL). Així, les HDL solen tenir una densitat de 1063-1250 mg/mL i un diàmetre d'entre 8 i 12 nm i tenen molts pocs nivells de triglicèrids i colesterol esterificat i molta proporció d'apolipoproteïnes sent les més abundants l'ApoA-I, l'apolipoproteïna A-II (ApoA-II) i l'ApoE. Les LDL tenen una densitat d'entre 1019-1063 mg/mL i un diàmetre de 18-35 nm, tenen nivells baixos de triglicèrids però nivells elevats de colesterol esterificat i l'apolipoproteïna més abundant és l'apolipoproteïna B-100

(ApoB-100). Finalment, les VLDL tenen una densitat d'entre 950 i 1006 mg/mL i una mida d'entre 35 i 80 nm, i són molt riques en lípids, sobretot en triglicèrids, tenint menys proporció de colesterol esterificat; les apolipoproteïnes més comunes de les VLDL són ApoB-100, ApoE i Apolipoproteïna C (ApoC) (Figura 8) (266–268).

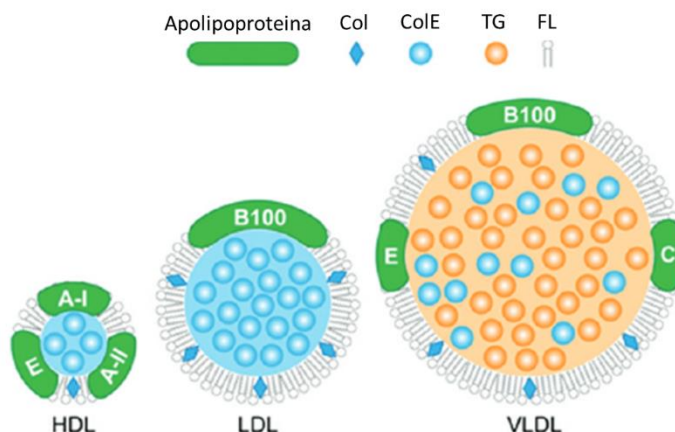


Figura 8. Representació esquemàtica de les diferents lipoproteïnes. HDL: de l'anglès, High Density Lipoprotein. LDL: de l'anglès, Low Density Lipoprotein. VLDL: de l'anglès, Very Low Density Lipoprotein. Col: colesterol. ColE: colesterol esterificat. TG: triglicèrid. FL: fosfolípid. Adaptada de Bricarello et al., (266).

La biosíntesi de les lipoproteïnes es dona principalment al fetge, tot i que també pot ocórrer a l'intestí, generant quilomicrons que serien lipoproteïnes encara més grans i menys denses que les VLDL (265). És important tenir en compte que les lipoproteïnes es poden subclassificar segons les seves propietats aterogèniques, sent pro-aterogèniques (LDL, VLDL) o anti-aterogèniques (HDL). De forma general, les VLDL es sintetitzen al fetge i transporten colesterol i triglicèrids del fetge cap als teixits. Les VLDL poden ser processades per la lipasa de lipoproteïnes (LPL) del múscul i teixit adipós que eliminarà triglicèrids generant unes lipoproteïnes de densitat intermèdia anomenades IDL (de l'anglès, *Intermediate-Density lipoprotein*). Les LDL són derivades del metabolisme de les VLDL i IDL i són enriquides amb colesterol contenint menys triglicèrids (265). L'eliminació de les VLD, IDL i LDL es fa al fetge a través del receptor de LDL (LDLR) que reconeix tant ApoB-100 com ApoE i capta tant VLDL com IDL i LDL, internalitzant-les i degradant-les als lisosomes. Per altra banda, les HDL són

sintetitzades al fetge i són anti-aterogèniques per diversos motius. La funció més estudiada de les HDL és el transport revers del colesterol, que implica que transporten el colesterol dels teixits perifèrics al fetge per promoure la seva eliminació. Apart, també presenten moltes altres propietats ja que s'ha descrit que poden ser anti-oxidants, anti-inflamatòries, anti-trombòtiques i anti-apoptòtiques (265,269). A més, els nivells de les HDL són claus per mantenir l'homeòstasi del metabolisme lipídic i prevenir malalties cardiovasculars (270). Les capacitats anti-aterogèniques i anti-inflamatòries de les HDL es duen a terme principalment per apolipoproteïnes i enzims com la paraoxonasa 1 (PON-1), lectin-colesterol aciltransferasa (LCAT) i la fosfolipasa A₂ associada a les lipoproteïnes (Lp-PLA₂) (265,271,272).

Degut a la separació entre el metabolisme lipídic perifèric i cerebral, les lipoproteïnes i apolipoproteïnes cerebrals es solen sintetitzar al propi cervell. En aquest sentit, astròcits i micròglia sintetitzen les apolipoproteïnes ApoE i ApoJ, que són les majoritàries al cervell, i la biogènesi de lipoproteïnes cerebrals es fa a partir d'aquestes dues apolipoproteïnes, sent principalment lipoproteïnes semblants a les HDL perifèriques (267,273,274). Malgrat que encara no es coneix del tot el rol de les lipoproteïnes al cervell, se sap que tenen funcions importants pel que fa a regular la funcionalitat neuronal, el balanç d'energia i el pes corporal (274). De totes maneres, cal tenir en compte que una part de les HDL són capaces de creuar la BHE, i que variacions en el metabolisme lipídic perifèric poden tenir un efecte en l'homeòstasi cerebral.

Per altra banda, és important tenir en compte que, com que les lipoproteïnes són entitats biològiques diverses i heterogènies (275), no només els seus nivells són importants, però també la seva composició. En concret, les HDL tenen molta varietat en quant a la seva composició d'apolipoproteïnes i enzims, afectant a la seva funcionalitat (269). De manera general les HDL es poden classificar en dues subfraccions, HDL2 i HDL3 segons la seva densitat després d'ultracentrifugar, sent HDL3 les més denses (276) i la ratio HDL2/HDL3 s'ha associat amb síndrome metabòlic i fetge gras (277,278).

5.2 Relació entre el metabolisme lipídic i la β -amiloïdosi cerebral

Actualment es creu que el metabolisme lipídic i la β -amiloïdosi cerebral estan estretament relacionats per diferents motius. Primerament, es creu que hi ha una relació des del punt de vista clínic, on desordres del metabolisme lipídic com serien la diabetis de tipus 2, dislipèmia, arterioesclerosi, hipercolesterolèmia i la obesitat són considerats

un factor de risc important per la MA o deteriorament cognitiu (160,279–281) i s'ha proposat que dietes altes en greixos, glucosa i colesterol poden augmentar la incidència de MA en edats avançades (282). En aquest sentit, una revisió sistemàtica de 25 estudis va suggerir que la medicació amb estatines, que redueixen els nivells lipídics perifèrics, podria estar relacionada amb un menor risc de patir MA així com de disminuir la progressió de la malaltia (283). A més, s'ha observat que nivells baixos de HDL estan associats amb demència (284) i nivells alts amb menys risc de patir la MA (285,286). En aquest sentit, nivells baixos de HDL i alts de LDL s'han relacionat amb nivells més elevats d'A β cerebrals detectats per PiB PET (279) i les HDL s'han proposat com a protectores a nivell cerebrovascular en malalties associades al dipòsit cerebral d'A β (287). Apart dels nivells, la composició de les HDL també s'ha vist alterada en pacients amb MA i altres tipus de demència (288,289). Concretament, en un estudi només van observar canvis en PON-1 de les HDL entre pacients amb MA i controls (288), mentre que en un altre estudi més recent sí que van observar varies alteracions en les HDL de pacients amb MA, en concret, una ràtio major de colesterol/ApoA-I i d'ApoD/ApoA-I i una menor ràtio d'ApoA-II/ApoA-I i d'ApoE/ApoA-I que en mostres de participants control (289).

Per altra banda, està àmpliament demostrat que nivells baixos de colesterol total i en les LDL i nivells alts de colesterol en les HDL estan associats amb una major probabilitat de patir una HIC, símptoma principal de l'AAC (71,290,291). Així, nivells baixos de colesterol LDL s'han associat a un volum d'HIC més gran i una resolució més lenta de l'HIC, així com a una major mortalitat de forma aguda després de l'HIC (292,293). A més, nivells baixos totals de colesterol i alts de HDL s'han associat a la presència de microsagnats cerebrals lobars, un dels trets característics de l'AAC (294,295).

També cal recalcar que, com hem comentat, el genotip d'APOE és un dels factors genètics més importants tant per la MA com l'AAC esporàdiques. El gen d'APOE codifica per l'apolipoproteïna E (ApoE), una proteïna amb un rol molt important en la regulació del metabolisme lipídic, com explicarem a continuació. Apart d'APOE, diversos GWAS han trobat SNPs de diferents gens relacionats amb la MA, alguns d'ells sent gens involucrats en el metabolisme lipídic com SORL1, ABCA7, CLU, PLD3, APOC3 i APOA1 (235,296–298).

En models experimentals de ratolins de MA/AAC s'ha estudiat el paper del metabolisme lipídic en la ocurrència i progressió de la malaltia. Per exemple, s'ha descrit que en

ratolins APP23 una dieta crònica rica en greixos augmenta la càrrega amiloide i empitjora els dèficits de memòria espacial (299,300). També, s'ha descrit que ratolins APP23 deficients d'ABCA1, una proteïna implicada amb la biogènesi de les HDL tant al fetge com al cervell, presenten major acumulació d'A β cerebral (301), i amb la sobreexpressió d'ABCA1 disminueixen els nivells d'A β cerebral (21). Finalment, ratolins APP/PS1 deficients per l'apolipoproteïna A-I (ApoA-I) presenten una major càrrega d'AAC i dèficit de funció cognitiva (302) mentre que la sobreexpressió d'aquesta proteïna en el mateix model s'ha associat a menys AAC i prevenció del deteriorament cognitiu (303).

5.2 Apolipoproteïna E (ApoE)

L'ApoE és una glicoproteïna de 36 KDa que s'expressa principalment al fetge i al cervell. De fet, és l'apolipoproteïna majoritària del cervell, secretada per astròcits en condicions fisiològiques i per micròglia i en menys quantitat neurones en condicions patològiques (304). L'ApoE està implicada en la regulació del metabolisme lipídic, processos de neuroinflamació, així com d'agregació i aclariment d'A β , tot i que el seu rol en la β -amiloïdosi encara no està del tot esclarit, estant en procés d'investigació constant (304).

El genotip d'APOE es considera el major factor de risc per patir la MA i AAC esporàdics. Hi ha 3 al·lels del gen APOE que canvien l'expressió dels aminoàcids 112 i 158 de la proteïna afectant a la seva funcionalitat. La forma majoritària és APOE ϵ 3 (C112-R158), existint els al·lels alternatius d'APOE: ϵ 2 (C112-C158) i ϵ 4 (R112-R158) (305). Com hem comentat, l'al·lel ϵ 4 es relaciona amb un major risc de patir β -amiloïdosi cerebral, tant MA com l'AAC i AAC capil·lar (7,147,232). Més enllà de la seva associació amb l'acumulació d'A β en cervell, l'al·lel ϵ 4 està associat a HIC i microsagnats lobars (148,149). Per altra banda, l'al·lel ϵ 2 es considera protector per la MA amb els portadors de l'al·lel tenint una menor probabilitat de patir MA de manera dosi-dependent, sent encara menor en portadors homozigots (ϵ 2/ ϵ 2) (233,234,306). En aquest sentit, s'ha descrit que portadors de l'al·lel ϵ 2 que acaben desenvolupant MA, ho fan a una edat més avançada (307) i amb canvis neuropatològics (distribució de plaques A β i de cabdells neurofibril·lars) més lleus (234). Cada cop més evidències suggereixen que ApoE ϵ 2 és protector per la MA tant per processos relacionats amb A β , com per exemple un millor aclariment, com per mecanismes independents d'A β , com modulant la inflamació i sent un al·lel

relacionat amb més longevitat de vida (308,309). Contràriament, ser portador de l'al·lel $\epsilon 2$ en APOE és un factor de risc per patir HIC associada a l'AAC (150). De fet, s'ha proposat que l'al·lel $\epsilon 4$ promou el dipòsit d'A β cerebral, mentre que l'al·lel $\epsilon 2$ afavoreix la ruptura dels vasos amb AAC a partir de canvis en aquests (2,31). A més, ha estat extensament descrit que l'al·lel $\epsilon 2$ augmenta de manera significativa els nivells totals d'ApoE en plasma, mentre que l'al·lel $\epsilon 4$ els disminueix (156,310), en diferents cohorts, incloent pacients amb MA (311) i amb AAC (156).

Pel que fa a les interaccions d'ApoE amb el pèptid A β , el seu rol no està del tot clar. Hi ha diferents estudis amb models experimentals de β -amiloïdosi cerebral on es veu que l'eliminació de l'expressió d'ApoE disminueix els nivells d'A β fibril·lar (24,312,313), però alhora l'expressió d'ApoE humana també disminueix els dipòsits i a més de forma dependent de la isoforma d'ApoE ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$) (24,314). De fet, es creu que això és degut a que l'ApoE probablement estigui involucrada tant en la formació de les fibril·les d'A β com en el seu aclariment. En aquest sentit, s'ha proposat que ApoE pot modular la sortida d'A β a través de la BHE utilitzant el receptor LRP1 o la fagocitosi per part dels astròcits amb el mateix receptor, sent menor el rendiment de la isoforma ApoE $\epsilon 4$ que $\epsilon 2$ i $\epsilon 3$ (315–319). A més, en un estudi recent han proposat un tractament amb un anticòs anti-ApoE que detecta de manera específica l'ApoE codipositada amb l'A β cerebral amb l'objectiu de segrestar i eliminar l'A β de forma indirecte, obtenint resultats molt prometedors en un model *in vivo* (320). Actualment segueixen sent necessàries investigacions sobre ApoE i β -amiloïdosi cerebral ja que encara no s'ha arribat a un consens sobre la implicació de la modulació dels seus nivells, tenint un paper molt complex en la patologia.

A nivell cerebral, s'ha descrit àmpliament que ApoE codiposita amb A β tant a nivell parenquimatós com vascular, resultats validats també pel nostre grup (151,321). En aquest estudi, es van observar nivells significativament més alts de proteïna ApoE als vasos corticals de pacients amb AAC que havien patit una HIC (151). Pel que fa als nivells circulants d'ApoE, s'han descrit nivells més baixos d'ApoE (322) en pacients amb MA, mentre que nivells més alts d'ApoE en plasma s'han associat a una reducció de la β -amiloïdosi (323). A

més, recentment s'ha descrit que pacients amb MA presenten nivells més baixos d'ApoE en les HDL (289). En aquest sentit, nivells d'ApoE elevats es consideren ateroprotectors i HDLs enriquides amb ApoE són capaces de disminuir la càrrega d'AAC en un model *in vitro* de vasos sanguinis generats a partir de bioenginyeria (324,325).

Tot i que s'ha investigat molt sobre el rol de l'ApoE en un context de β -amiloïdosi cerebral, encara hi ha molts interrogants oberts. En aquesta tesi doctoral ens hem centrat en estudiar la distribució d'ApoE circulant de forma lliure o en les diferents lipoproteïnes en cohorts de MA i de pacients amb sospita clínica d'AAC, per tal d'aportar més coneixement sobre el seu possible paper en l'acumulació i localització de l'A β cerebral.

5.3 Apolipoproteïna J (ApoJ)

L'ApoJ, també anomenada clusterina (Clu) és la segona apolipoproteïna més expressada al cervell, darrere d'ApoE. L'ApoJ és una glicoproteïna multifuncional heterodimèrica de 80 KDa. És important recalcar que es troba expressada de manera constitutiva a molts teixits i es pot trobar al plasma de forma lliure (80%), i en HDL (20%), però també en menor proporció en LDL i VLDL (326,327). Apart del seu rol en el transport lipídic (274), ApoJ té moltes altres funcions, tals com modular la resposta immune (328), la supervivència i mort de cèl·lules (327) i actuar com a xaperona fisiològica (329).

A nivell de genotip, quatre polimorfismes diferents de CLU, el gen que codifica per ApoJ, s'han associat a la MA, concretament els SNPs: rs7012010 (C) i rs9331888 (G) com a factors de risc per patir MA (327,330–332) i rs11136000 (T) i rs9331896 (C) com a protectors de patir MA (327). Alguns SNPs de CLU, s'han associat a l'expressió d'ApoJ, i de fet, la variant protectora rs11136000 (T) s'ha associat a major expressió d'ApoJ (332–335). En estudis *post-mortem* de pacients amb β -amiloïdosi cerebral s'ha observat que hi ha una colocalització d'ApoJ amb A β cerebral, tant parenquimatós com vascular (151,321,336–339), però a més, s'han detectat complexos d'ApoJ-A β al LCR i en plasma, indicant també que podria tenir un paper important en l'aclariment del pèptid amiloide del cervell (319,320). En termes de la proteïna circulant, s'han descrit nivells d'ApoJ elevats en el plasma de pacients amb MA

(340,341) així com de pacients que han patit una HIC associada a l'AAC (156), tot i que no en tots els estudis s'han vists aquestes diferències (342,343). En aquest sentit, s'ha proposat que els nivells d'ApoJ en plasma augmenten de manera dependent amb l'edat com una resposta protectora (344), entenent que el mateix podria passar en el cas de la MA i l'AAC. Pel que fa al seu paper al LCR, en un estudi recent, s'ha descrit que pacients amb deteriorament cognitiu tindrien uns nivells inferiors d'ApoJ en LCR (345). Els mateixos autors de l'estudi proposen que la funcionalitat d'ApoJ en LCR seria promoure la capacitat d'efluxió de colesterol de les HDL fent-les més ateroprotectors (345). A més, també s'ha proposat que els nivells d'ApoJ al LCR varien segons l'etapa clínica de la MA, estant disminuïts en les primeres etapes, i elevats en etapes més avançades on ja hi ha neurodegeneració (346), aquest augment dels nivells d'ApoJ en fases més avançades també es podria interpretar com una resposta protectora. Pel que fa a la interacció d'ApoJ amb A β , se sap que aquesta pot prevenir la fibrol·logènesi (347–349) i toxicitat (350) d'A β *in vitro*. Però cal tenir en compte que el paper d'ApoJ en l'agregació d'A β depèn de manera molt sensible a la ràtio d'ApoJ amb A β (350). S'ha descrit que ApoJ unida a A β pot interactuar amb el receptor LRP2 també anomenat megalina, promovent l'aclariment d'A β a través de la BHE (315,336,351), de manera semblant al que fa ApoE quan s'uneix a LRP1 (315–319). A més, també es creu que ApoJ pot afavorir la fagocitosi d'A β per part de la micròglia unint-se al receptor TREM2 (352). Tal i com succeeix amb ApoE, el rol d'ApoJ en la β -amiloïdosi cerebral encara no està del tot clarit. En models d'experimentació animals de β -amiloïdosi cerebral on s'elimina l'expressió d'ApoJ transgènicament, s'han observat resultats contradictoris, alguns en què disminueix l'agregació d'A β cerebral (353), altres on disminueix la parenquimatosos però augmenta la vascular (354) i en un estudi on utilitzen un animal heterozigot per disminuir l'expressió d'ApoJ en astròcits fins i tot augmenta la quantitat d'A β agregada al cervell (347,353,354). De fet, s'ha descrit que tot i que l'eliminació de l'expressió de CLU en un model de β -amiloïdosi cerebral resulta en una disminució de l'acumulació d'A β , però que aquest efecte es perd amb l'edat (355). En canvi, els estudis que es basen en augmentar els nivells d'ApoJ, tant a partir de tractament com amb models transgènics, presenten resultats molt més homogenis, ressaltant una funció

protectora de l'ApoJ. Per exemple, en un estudi recent s'ha observat que la sobreexpressió d'ApoJ en astròcits en un model de β -amiloïdosi cerebral disminuïa la càrrega d'A β (347). En aquest sentit, altres estudis on es tracta amb ApoJ o pèptids mimètics d'ApoJ, també s'ha vist una disminució de la càrrega d'A β (356–358). De fet, el nostre grup va realitzar prèviament un estudi que es basava en administrar ApoJ recombinant humana (rhApoJ) per via intravenosa a ratolins APP23 de mitjana edat (15 mesos) de forma subcrònica, el qual va permetre descriure com el tractament aconseguia reduir els nivells d'A β depositats al cervell (359). Més concretament, el tractament amb rhApoJ perifèrica reduïa significativament els nivells cerebrals d'A β_{40} i A β_{42} insolubles, així com el nombre de plaques d'A β i la càrrega d'AAC. Per altra banda, l'administració subcrònica de rhApoJ va reduir la pèrdua neuronal hipocampal, disminuint la neurodegeneració (359). Per últim, es va observar que el tractament amb rhApoJ augmentava l'activitat fagocítica per part de la micròglia, sense induir un estat inflamatori cerebral generalitzat (359).

Degut als resultats prometedors sobre ApoJ descrits a la literatura i pel nostre propi grup en un context de β -amiloïdosi cerebral, en aquesta tesi hem profunditzat en l'estudi de l'ApoJ i CLU en una cohort de pacients d'AAC, així com en un model experimental de la malaltia.

Objectius



La β -amiloïdosi cerebral té un impacte enorme en la societat actual, essent l'angiopatia amiloide cerebral (AAC) la principal causa d'hemorràgia intracerebral (HIC) lobar en poblacions d'edat avançada i, la malaltia d'Alzheimer (MA) la principal causa de demència a nivell mundial. L'AAC està caracteritzada per la presència de marcadors radiològics de malaltia de petit vas detectats per ressonància magnètica nuclear (RMN). A nivell clínic, no disposem de tractaments i segueixen faltant biomarcadors per l'AAC, fent difícil el seu diagnòstic i la predicció de l'evolució clínic. Actualment existeixen evidències sobre la relació entre el metabolisme lipídic perifèric i proteïnes circulants, com ApoE i ApoJ, amb la β -amiloïdosi cerebral, tot i que el seu paper segueix sent poc conegut. Així, els objectius generals d'aquesta tesi es basen en entendre millor el paper del metabolisme lipídic perifèric en un context de β -amiloïdosi cerebral, així com trobar possibles biomarcadors i tractaments per l'AAC.

Les hipòtesis de les que parteix aquesta tesi doctoral són les següents:

- Nivells circulants d'ApoJ i ApoE i la seva distribució en les diferents lipoproteïnes estan associats amb l'acumulació i localització de l'A β cerebral.
- Augmentar els nivells d'ApoJ circulants pot ser una estratègia terapèutica per tractar o prevenir l'AAC.

Els objectius específics d'aquesta tesi doctoral són els següents:

- 1) Identificar possibles associacions entre marcadors genètics candidats i la distribució d'ApoJ i ApoE en lipoproteïnes plasmàtiques amb trets radiològics característics de l'AAC detectats per RMN en una cohort de pacients amb HIC lobar.
- 2) Determinar les possibles diferències en el perfil lipídic i la distribució d'ApoJ i ApoE en les lipoproteïnes circulants en plasma en pacients amb AAC, MA i controls.
- 3) Dur a terme un estudi pre-clínic per determinar l'efecte d'ApoJ recombinant administrada perifèricament en un model de ratolí transgènic de β -amiloïdosi cerebral, centrant-nos en l'impacte cerebrovascular analitzant el número de microhemorràgies cerebrals per RMN.

Mètodes



1. Estudis clínics

1.1 Poblacions d'estudi

1.1.1 Pacients amb sospita clínica d'AAC

La cohort consistia de 126 pacients que havien patit com a mínim una hemorràgia intracerebral (HIC) lobar i tenien sospita clínica d'AAC. Aquests pacients es van reclutar en una visita de seguiment en un estudi multicèntric on van participar 11 hospitals d'Espanya: Hospital Universitari Vall d'Hebron, Hospital Universitario Cruces, Hospital Universitari Son Espases, Hospital Universitario de Donostia, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Hospital Universitario Virgen de Macarena, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau i Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. Tots els pacients eren majors de 55 anys i es van excloure els pacients amb HIC profunda simptomàtica i els tractats amb teràpies anticoagulants. Tots els pacients van proporcionar un consentiment informat firmat abans de la inclusió a l'estudi.

La informació obtinguda d'aquesta cohort consistia en: data de reclutament, data de l'HIC, característiques demogràfiques com el sexe i l'edat, i factors de risc vascular rellevants com la hipertensió arterial (HTA), diabetis mellitus (DM) i dislipèmia (DL); així com medicació i estat cognitiu. A més, es va obtenir una mostra de sang de tots els pacients en una visita de seguiment. En la majoria d'aquests pacients (n=118, 96%) es va obtenir informació de la ressonància magnètica nuclear (RMN) de seguiment.

A partir d'aquesta població es van poder dur a terme l'objectiu 1 i 2 (Figura 10). Pel primer objectiu (estudi 1) es van estudiar tots els pacients pel que fa a característiques genètiques (n=126) i radiològiques (n=118) i un subgrup de 60 pacients per estudiar els marcadors plasmàtics. D'aquest subgrup es van seleccionar 51 pacients amb diagnòstic d'AAC segons els criteris de Boston 1.5 i sense demència pel segon objectiu (estudi 2).

L'estudi va ser aprovat pel comitè ètic d'investigació de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya (PR(AG)326/2014) i tenia l'aprovació dels comitès ètics

de tots els centres participants. L'estudi es va dur a terme seguint la declaració de Helsinki.

1.1.2 Pacients amb MA

La cohort de pacients amb MA consistia en 60 pacients que presentaven MA probable segons el criteri NIA-AA (360). Tots els pacients presentaven demència de lleu a moderada segons el MMSE (de l'anglès, *mini-mental state examination*) (361) amb una mitja de 18 ± 4 . Cap dels pacients presentava història d'ictus, ni isquèmic ni hemorràgic. Tots els pacients amb MA van ser reclutats a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i van proporcionar un consentiment informat firmat abans de la inclusió a l'estudi.

La informació obtinguda d'aquesta cohort consistia en data d'inclusió, característiques demogràfiques com sexe i edat, factors de risc vasculars rellevants com HTA, DM i DL, i medicació. A més, es va obtenir una mostra de sang de cada pacient.

Aquesta cohort es va utilitzar per l'objectiu 2 (estudi 2) (Figura 10). L'estudi va ser aprovat pel comitè ètic d'investigació de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya (PR(AG)326/2014) i es va dur a terme seguint la declaració de Helsinki.

1.1.3 Pacients amb hemorràgia intracerebral aguda

La cohort de pacients amb HIC consistia en 40 pacients que havien patit com a mínim una HIC, 18 en zones profundes del cervell i 22 amb una localització lobar. Aquesta cohort es va reclutar a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Es va realitzar una tomografia computeritzada (TC) cranial al moment d'arribada a l'hospital per tal de detectar l'HIC observada com una senyal hiperintensa (362). A més, es va mesurar el volum de l'HIC utilitzant un software semiautomàtic Hounsfield-unit de planimetria informatitzat basat en llindars. Es va analitzar la forma de l'HIC segons Barras et al (76), seguint una escala que va de l'1 al 5, sent 1 la forma més regular i 5 la més irregular (Figura 9).

Es va obtenir informació sobre les característiques demogràfiques (sexe, edat), medicació, genotip d'ApoE i factors de risc vascular com HTA, DM, DL i fibril·lació auricular (FA). En aquesta cohort es van obtenir mostres de sang en la fase aguda de l'ictus (<24 hores des del TC) i es van avaluar els paràmetres clínics plasmàtics de forma rutinària als laboratoris bioquímics de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Els paràmetres avaluats van ser: creatinina (mg/dL), fibrinogen (g/L), glucosa (mg/dL), hemoglobina (g/dL), ratio internacional normalitzada (INR), plaquetes (unitats/nL), temps de protrombina (s), temps de tromboplastina parcial (s), glòbuls blancs (unitats/nL).

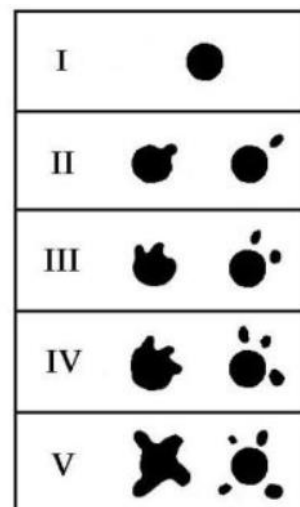


Figura 9. Escala categòrica de la forma de l'hemorràgia intracerebral, sent I la més regular i V la més irregular. Adaptada de Barras et al., (76).

Aquesta cohort es va utilitzar per ampliar els resultats obtinguts en el model animal, lligats amb l'objectiu 3 (estudi 3) (Figura 10). Aquest estudi va ser aprovat pel comitè ètic d'investigació clínica de Vall d'Hebron (PR(AG)269/2017) i dut a terme conforme la declaració de Helsinki.

1.1.4 Participants controls

Per aquesta tesi doctoral es van estudiar diferents cohorts de participants controls (Figura 10).

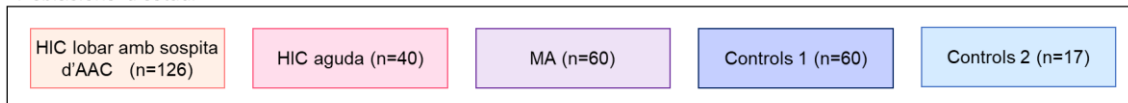
Pel segon objectiu (estudi 2), es van estudiar 60 participants controls emparellats per sexe i edat amb els pacients amb sospita d'AAC i d'AD de l'estudi. Tots els participants van ser reclutats a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Aquest estudi es va aprovar pel comitè ètic d'investigació clínica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Espanya (PR(AG)326/2014) i es va dur a terme seguint la declaració de Helsinki.

Pel tercer objectiu (estudi 3) es van estudiar 17 controls que no havien patit cap ictus previ reclutats en l'estudi PARIAS (de l'anglès, *Patients At Risk of Ischemic Acute Stroke*) en l'Hospital Virgen Macarena de Sevilla. Aquest estudi va ser aprovat pel comitè ètic d'investigació clínica local (2014PI/162-1) i es va dur a terme seguint la declaració de Helsinki.

Mètodes

En tots els casos es va obtenir informació sobre la data d'inclusió, característiques demogràfiques com sexe i edat, medicació i factors de risc vascular rellevants com HTA, DM, DL i FA. Es van obtenir mostres de sang de tots els participants.

Poblacions d'estudi



Estudis

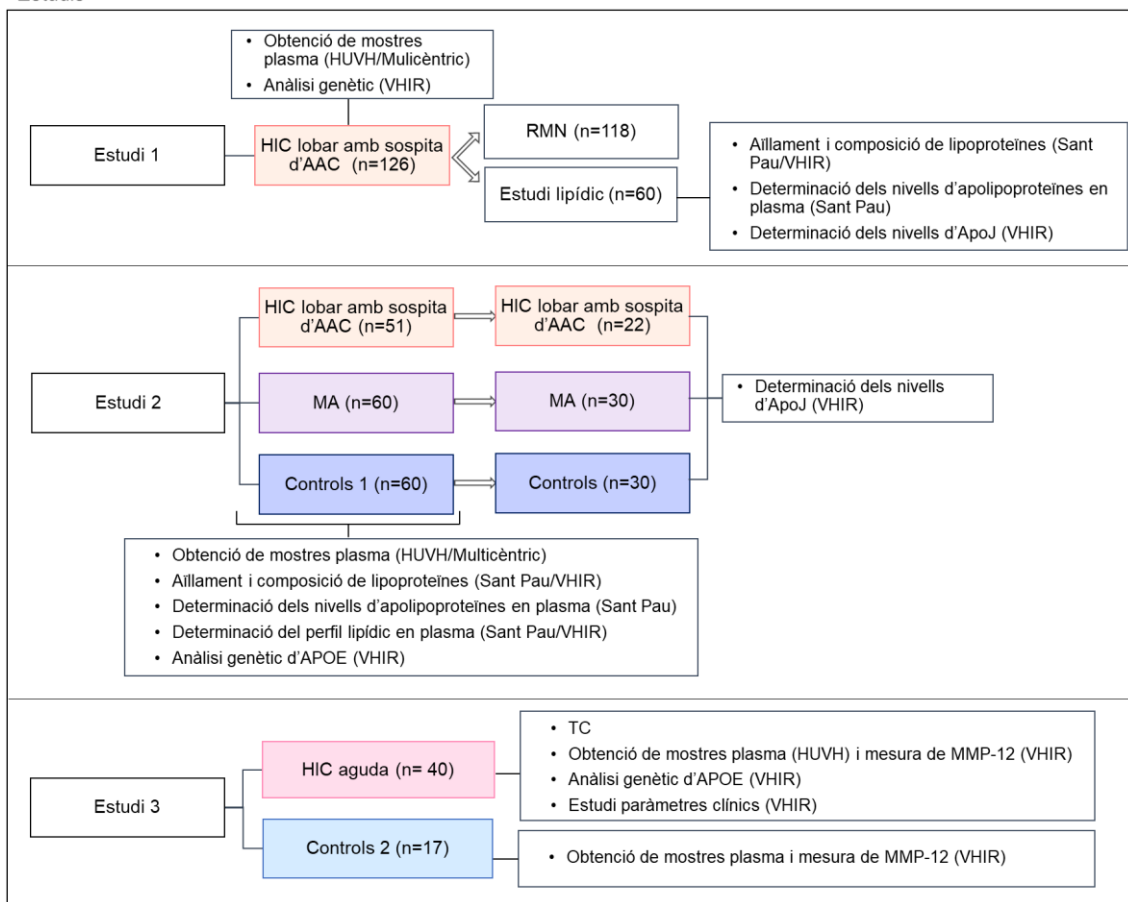


Figura 10. Diagrama de les poblacions d'estudi i dels estudis clínics realitzats. MA: Malaltia d'Alzheimer, AAC: angiopatia amiloide cerebral. HIC: hemorràgia intracerebral.

1.2 RMN cerebral

Es van adquirir RMN cerebrals de seguiment de la majoria dels pacients amb sospita clínica d'AAC (n=118, 96%). Aquesta informació es va analitzar en detall per l'estudi 1 i es va utilitzar per seleccionar els pacients amb sospita d'AAC per l'estudi 2 segons els criteris de Boston. La RMN es va adquirir amb un escàner corporal d'1.5 T amb propòsits clínics de diagnòstic. Aquesta RMN es va fer uns 6.70 ± 16.79 mesos des de l'HIC. En la RMN es van obtenir les següents seqüències: axial ponderada en T2 amb turbo spin-eco, axial ponderada en T1 amb spin-eco, axial ponderada en T2 amb turbo i FLAIR, i axial ponderada en T2* amb seqüència eco-planar i seqüència de eco-gradient. Totes les RMN van ser analitzades pel mateix neuroradiòleg a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, de manera cega a la informació biològica i clínica. Es van avaluar les següents lesions per RMN:

- Les HIC es van definir com focus hipointensos de més de 5 mm de diàmetre en imatges ponderades en T2*. Es van registrar el número i localització de HIC.
- La siderosi superficial cortical (SSc) es va definir com la presència de hipointensitats fines amb un patró curvilínia seguint els girs de la superfície cortical en imatges ponderades en T2*. Signes de SSc contigua o anatòmicament connectada a l'HIC no es va comptabilitzar. La SSc es va classificar com focal (restringida a ≤ 3 solcs) o disseminada (≥ 4 solcs), segons com s'havia descrit prèviament per Linn et al., (56).
- Els Espais perivasculars dilatats (EPVD) es van avaluar en imatges ponderades en T2 i es van classificar segons la localització als ganglis basals (GB) o al centrum semiovale (CSO). A més, es van valorar segons una escala visual de 4 punts prèviament descrita (0 = no EPVD, $1 \leq 10$ EPVD, 2 = 11-20 EPVD, 3 = 21-40 EPVD i 4 > 40EPVD) (363). Finalment es van classificar els EPVD com de grau baix (*low* en anglès) (≤ 20 EPVD) o alt (≥ 21 EPVD) (*high* en anglès).
- Els microsagnats cerebrals es van definir com hipointensitats en imatges ponderades en T2* de menys de 5 mm de diàmetre. Es va registrar tant el número com localització dels microsagnats cerebrals seguint l'escala BOMBS (de l'anglès, *Brain Observer Microbleed Scale*) (364). A més,

segons el número de microsagnats lobars, es van classificar els pacients com 5 o menys microsagnats lobars (≤ 5 microsagnats lobar) o més de 5 (>5 microsagnats lobar).

- Les hiperintensitats o lesions de substància blanca (LSB) es van classificar com senyals hiperintenses en imatges ponderades en T2 o T2-FLAIR. Les LSB es van classificar com a profundes o periventriculars segons la seva localització i es van valorar utilitzant l'escala de qualificació Fazekas (365). Per les LSB periventriculars: 0 = absència, 1 = forma de gorra o traç de llapis molt fi, 2 = aura (*halo*, en anglès) suau, 3 = lesions LSB irregulars estenent-se cap a la substància blanca profunda. I per les LSB profundes: 0 = absència, 1 = lesions focals, 2 = lesions confluents inicials, 3 = lesions difuses molt extenses. Les LSB es van avaluar en l'hemisferi no afectat per l'hemorràgia excepte en casos on els dos hemisferis estaven afectats.
- L'atròfia cerebral (cortico-subcortical) es va valorar visualment i es va classificar com lleu, moderada o severa.

L'anàlisi de RMN va permetre la classificació dels pacients segons els criteris de Boston 1.5 (56). A més, tots els pacients es van classificar segons l'escala CAA-SVDB que va de 0 a 6 punts i està basada en la presència i grau de microsagnats cerebrals, SSc, EPVD-CSO i LSB (112). Per finalitzar, vam subclassificar els pacients en l'escala CAA-SVDB com grau baix (≤ 3) o alt (≥ 4).

1.3 Obtenció de mostres de plasma

Es van obtenir mostres de sang dels participants de tots els estudis. En tots els casos, es va obtenir la sang en tubs Vacutainer d'àcid etilendiamintetraacètic (EDTA) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Seguidament, la sang es va centrifugar a 2500 rpm durant 15 minuts a 4°C i el plasma es va aliquotar i congelar a -80°C immediatament fins el seu ús.

1.4 Aïllament i composició de lipoproteïnes

L'aïllament i estudi de la composició de lipoproteïnes es va dur a terme pels objectius 1 i 2 (estudi 1 i estudi 2) (Figura 10).

Les lipoproteïnes es van aïllar a partir del plasma per un procés d'ultracentrifugació seqüencial per flotació segons la densitat: VLDL (1.006–1.019 g/mL), LDL (1.019–1.063 g/mL), i HDL (1.063–1.210 g/mL). La composició lipídica i proteica es va determinar mesurant el contingut de colesterol, triglicèrids, ApoB, ApoA-I (Roche Diagnostics, Basel, Suïssa), fosfolípids, colesterol lliure (Wako Pure Chemical, Osaka, Japó), ApoA-II, ApoE i ApoC-III (Kamiya Biomedicals, Seattle, WA, USA) en un autoanalitzador Cobas 6000/c501 (Roche Diagnostics). El colesterol de les fraccions lipídiques va ser quantificat de manera rutinària utilitzant un sistema de HDL-colesterol directe (HDL-C plus) o per ultracentrifugació si la concentració de TG era major a 3 mmol/L, d'acord amb el National Cholesterol Education program (366). Tant l'aïllament com la determinació de la composició de les lipoproteïnes es va dur a terme en col·laboració amb el grup de bioquímica cardiovascular de l'Institut de Recerca de Hospital de Sant Pau i de Santa Creu.

El contingut d'ApoJ es va analitzar utilitzant un kit comercial ELISA (de l'anglès, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Mabtech, Stockholm, Suècia), després d'haver diluït les mostres a la mateixa concentració de colesterol. La quantificació d'ApoJ es va fer a l'institut de recerca de Vall d'Hebron (VHIR) en una subcohort de l'estudi 1 i 2 (Figura 10).

1.5 Determinació dels nivells d'apolipoproteïnes en plasma

Els nivells plasmàtics d'apolipoproteïnes B, A-I, A-II, E i C-III totals es van quantificar al grup de bioquímica cardiovascular de l'Institut de Recerca de Hospital de Sant Pau i de Santa Creu en un autoanalitzador Cobas 600/c501 utilitzant reactius de Roche Diagnostics per ApoB i ApoA-I i de Kamiya Biomedical Company per ApoA-II, ApoE i ApoC-III. Aquests nivells es van mesurar per la subcohort de l'estudi 1 i la cohort de l'estudi 2 (Figura 10).

Igual que en el cas de les lipoproteïnes, la quantificació d'ApoJ plasmàtica es va dur a terme al VHIR utilitzant un kit ELISA comercial (Mabtech) en una subcohort de l'estudi 1 i 2 (Figura 10). Les mostres amb resultats nuls es van descartar de l'anàlisi.

1.6 Determinació del perfil lipídic en plasma

Les determinacions plasmàtiques que descrivim a continuació són anàlisi específics que es van dur a terme pels participants del segon estudi (Figura 10).

El perfil lipídic dels participants (colesterol total, TG, i colesterol de VLDL, LDL i HDL) es va determinar a la unitat bioquímica clínica de l'Hospital Vall d'Hebron utilitzant un autoanalitzador AU5800 (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) utilitzant reactius de Beckman Coulter.

Totes les determinacions següents es van dur a terme a l'Institut de Recerca de Hospital de Sant Pau i de Santa Creu. Es va analitzar la mida de les LDL i les subfraccions de HDL a partir d'electroforesi en gels de gradient de poliacrilamida (2-5%-16%) tal i com s'ha descrit prèviament (367). De manera resumida, la mida de les LDL va ser mesurada a partir d'un estàndard de 4 bandes de LDL, i la ratio de HDL2/3 es va calcular a partir de les intensitats de les bandes HDL2 i HDL3.

L'activitat de Lp-PLA₂ es va mesurar utilitzant el 2-tio-PAF (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) com a substrat, tal i com ha estat prèviament descrit (368) i seguint les instruccions del comerciant. La distribució de Lp-PLA₂ en les diferents lipoproteïnes va ser valorada precipitant lipoproteïnes amb ApoB amb sulfà de dextrans com ha estat prèviament descrit (369).

Per estudiar la susceptibilitat d'oxidació de les LDL i HDL primer es van dialitzar les lipoproteïnes amb PBS (de l'anglès, *Phosphate-buffered saline*) pH 7.4 en una cromatografia de filtració per gel en una columna PD10 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Tot seguit, es va avaluar la susceptibilitat d'oxidació monitoritzant la formació de conjugats "dienes" a 234 nm en un espectrofotòmetre Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). Aquesta avaluació es va fer incubant les LDL o HDL diluïdes a 0.15 mM de colesterol amb 5 µM de CuSO₄ i es va determinar el temps de la fase de retard (*lag phase* en anglès) de la cinètica d'oxidació (370).

Finalment, es va analitzar també la capacitat antioxidant de les HDL. HDL diluïdes a 0.15 mM de colesterol es van incubar amb un estàndard de LDL

(obtingut d'un pool de plasma normolipidèmic emmagatzemat amb 10% de sucrosa a -80°C). Es va induir oxidació afegint $5\ \mu\text{M}$ de CuSO_4 i es va monitoritzar la formació de conjugats "diene" tal i com hem descrit al paràgraf anterior. Els resultats estan expressats com la capacitat de les HDL de prolongar la fase de retard (*lag phase* en anglès) del pool de LDL, comparant-lo amb el pool LDL sense incubar amb HDL (371).

1.7 Anàlisi genètic

Tots els anàlisi genètics es van dur a terme a partir d'ADN extret de mostres de plasma al biobanc de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (PT17/0015/0047) integrat a la xarxa de biobancs nacionals espanyols.

Dels pacients amb sospita d'AAC (estudi 1), es va fer un anàlisi genètic molt més extens de SNPs utilitzant SNPlex™ al Centre de genotip nacional espanyol (CEGEN). Els SNPs estudiats van ser: rs6656401 i rs6701713 de CR1, rs4311 de ACE, rs11136000, rs7012010, rs9331896 i rs9331888 de CLU, rs4147929 i rs3764650 de ABCA7, rs3851179 i rs10792832 de PICALM, rs744373 i rs6733839 de BIN1, rs11767557 i rs11771145 de EPHA1, rs3865444 de CD33, rs9349407 i rs10948363 de CD2AP, rs11218343 de SORL1, rs9271192 de la regió HLA-DRB5-DRB1, rs28834970 de PTK2B, rs6910730 de TREM1, rs75932628 de TREM2, rs3747742 de TREML2, rs4938933 i rs983392 de MS4A6A, rs429358 y rs7412 d'APOE per determinar el genotip d'APOEε. També es va genotipar al CEGEN utilitzant SNPlex™ els SNPs rs429358 y rs7412 d'APOE per determinar el genotip d'APOEε en la cohort del segon estudi i els pacients amb HIC del tercer estudi (Figura 10).

2. Producció i purificació de proteïna ApoJ recombinant humana (rhApoJ)

El procés de producció i purificació de proteïna ha estat prèviament descrit pel nostre grup (359,372,373) i està resumit gràficament a la Figura 11.

2.1 Cultius cel·lulars per producció de rhApoJ

La producció de proteïna ApoJ recombinant humana (rhApoJ) es va fer transfectant una línia cel·lular de cèl·lules embrionàries de ronyó humà

(HEK293, de l'anglès, *Human embryonic kidney 293 cells*) per tal de que expressessin rhApoJ i després poder purificar-la a partir del medi de cultiu.

2.1.1 Manteniment i subcultiu de cèl·lules HEK293

Les cèl·lules HEK293 es cultiven en medi complet Dulbecco-modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) suplementat amb 10% de sèrum boví fetal (FBS, de l'anglès, *fetal bovine serum*) (Gibco), 100 U/mL de penicil·lina (Gibco) i 100 µg/mL d'estreptomicina (Gibco) (P/S) i es mantenen sempre en una incubadora a 37°C i 5% de CO₂. De manera general, les cèl·lules HEK293 se sembren en un T-flask de 75 cm² (T-75).

Un cop s'arriba a la confluència cel·lular, el cultiu es divideix per tal d'expandir-lo. El procés és el mateix si es volen sembrar les cèl·lules per un experiment. Es tracten les cèl·lules amb una solució de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) durant 2 minuts a 37 °C. Un cop dissociades les cèl·lules es neutralitza l'acció de la tripsina afegint el doble de volum de medi de cultiu i es centrifuga a 1500 rpm a 37 °C 5 minuts. Tot seguit, es re-suspèn el pellet en medi complet i es fa el comptatge cel·lular amb el principi d'exclusió del colorant Trypan Blue en una càmera de Neubauer. Finalment, es dilueix la suspensió inicial amb la quantitat de medi necessari per tal d'arribar a la densitat cel·lular desitjada i sembrar les cèl·lules en nous *flasks* o plaques, o ve posar-les a vials per procedir a la congelació per una conservació a llarg termini.

2.1.2 Transfecció de cèl·lules HEK293

Per tal de transfectar les HEK293, es sembren les cèl·lules en plaques de 24 pous; 500 µL amb 25.000 cèl·lules per cada pou en DMEM i 10% de FBS. Després de 48 hores, fins que les cèl·lules arriben a un 50% de confluència, es transfecten les HEK293 amb un vector pcDNA4.0TM (Abgent, Clairemont, San Diego, USA) que conté ApoJ cDNA humà, generant HEK293 transfectades (HEK293T). En més detall, el vector consisteix d'un plasmidi amb el cDNA humà del gen CLU, i gens de resistència a l'Ampicil·lina i Zeocina per tal de poder seleccionar les cèl·lules transfectades. A més, la proteïna recombinant ApoJ humana generada conté una etiqueta V6-His

(histidina) a la N-terminal per tal de poder dur a terme la purificació de la proteïna.

Per fer la transferència es dilueixen 5 µg del vector de cDNA en 250 µL d'OPTIMEM (Gibco) pre-calentat a 37°C. Alhora, es prepara una solució amb 3 µL de lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) en 250 µL d'OPTIMEM pre-calentat a 37°C. Passats 5 minuts, es fa una dilució 1:1 dels dos complexos (cDNA + lipofectamina 2000) i es deixa incubar aquest complex 15 minuts a temperatura ambient (RT, de l'anglès, *room temperature*). Tot seguit es canvia el medi amb 450 µL d'OPTIMEM i s'afegeixen 50 µL del complex transfectant gota a gota. Després de 24 hores, es canvia el medi dels pous per 500 µL de DMEM 5% FBS. Per tal de seleccionar els clons transfectats establement, 48 hores més tard es fa un canvi de medi DMEM 5% FBS amb Zeocin™ (Life technologies, Carlsbad, California, USA) 500 µg/mL. Posteriorment, el manteniment de les cèl·lules s'ha de fer amb DMEM 5% FBS i 200 µg/mL de Zeocin. Es poden observar cèl·lules HEK293T en la Figura 11.A. Cal comprovar que les cèl·lules s'han transfectat correctament fent un Western Blot (WB) del sobrenedant per tal de detectar ApoJ humana.

2.1.3 Emmagatzematge de cèl·lules (congelació i descongelació)

Per preservar les cèl·lules a llarg termini és necessari congelar-les. Per tal de congelar-les, es tripsinitzen i processen tal com hem explicat a l'apartat 2.1.1. Després del comptatge cel·lular, es resuspenen en un criovial amb medi de cultiu amb 20% de FBS i 1% de dimetilsulfòxid (DMSO; Sigma-Aldrich), un agent crioprotector, i es deixa reposar 15 minuts. Finalment els criovials es congelen a -80°C i posteriorment es passen a un tanc de nitrogen líquid. Pel procés de descongelació els criovials es treuen del tanc de nitrogen i s'introdueixen ràpidament a 37°C. Un cop la suspensió cel·lular està descongelada s'afegeix 1 mL de medi complet i es transfereix a un *flask* T75 amb 10 mL de medi a 37°C. A les 4 hores, es fa un canvi de medi per eliminar el DMSO i restes cel·lulars. En el cas de les HEK293T s'afegeix la concentració de manteniment dels clons estables de Zeocin (200 µg/mL).

2.1.4 Cultiu de HEK293T en HYPERFlask®

Per tal d'obtenir quantitats suficients de rhApoJ, s'han de cultivar les cèl·lules HEK293T en HYPERFlask® (Corning Inc., Corning, NY, USA) amb medi DMEM 10% FBS 1% P/S 100 µg/mL Zeocin (Figura 11.B). Aquest pas es fa passant tot el contingut d'un *flask* T75 confluent a l'HYPERFlask® (550 mL). A les 48 hores s'arriba a un 80% de confluència i es fa un canvi de medi a DMEM amb 0.1% FBS. Després de 48 hores, es recull tot el sobrenedant que es portarà a purificar; 48 hores més tard es pot tornar a recollir un altra lot de sobrenedant. Cada cop que es recull medi es separen uns µL per tal de comprovar que s'estigui expressant rhApoJ mitjançant un WB, tal i com explicarem més endavant. Els sobrenedants es congelen a -80°C fins la seva utilització.

2.2 Purificació de rhApoJ en el sistema AKTA

La proteïna rhApoJ expressada per les HEK293T conté una etiqueta V6-His (histidina) per tal de poder fer la purificació amb una resina quelant de níquel.

Pel procés de purificació, es descongelen els sobrenedants d'HEK293T i es filtren. Seguidament es fa la purificació utilitzant columnes de níquel HiScreen Ni FF column (GE Healthcare) en un purificador AKTA purifier 100 system (GE Healthcare) per cromatografia per afinitat de níquel a l'ICTS "NANOBIOSIS", unitat de plataforma de producció de proteïna al CIBER-BBN a la Universitat Autònoma de Barcelona (Figura 11.C).

Primerament s'ha de rentar la columna de níquel amb H₂O Mili-Q. Seguidament s'equilibra la columna amb el buffer d'equilibri (H₂O Mili-Q amb 5 M NaCl i 50 mM NaH₂PO₄ i pH 7.4). Tot seguit, es passa per la columna el sobrenedant de les HEK293T a una velocitat de 1.1 ml/min. Un cop ha acabat de passar tot el sobrenedant es torna a equilibrar la columna amb buffer d'equilibri. Seguidament es comença el procés d'elució on es va augmentant el gradient de buffer d'elució (H₂O Mili-Q amb 0.5 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ i imidazole 0.5M i pH 7.4). L'imidazole trenca la unió entre el níquel i la histidina, fent que s'elueixi la proteïna recombinant. Durant el procés d'elució s'observa un pic en el cromatograma de llum ultraviolada (UV) a 280 nm. Aquest primer pic correspon a proteïna que s'havia unit amb poca afinitat,

seguidament s'observa un segon pic que és específic de la rhApoJ (Figura 11.C). En aquest moment, s'atura el gradient de buffer d'elució i es recull la mostra en tubs d'1 mL fins que s'acaba el pic. Finalment, s'augmenta el gradient d'elució fins al 100% i es renta i equilibra correctament la columna de níquel.

Seguidament es fa una electroforesi amb tinció de Blue Coomassie (BlueSafe, NZYTech, Lisboa, Portugal) de les fraccions d'elució claus del segon pic per comprovar quines fraccions contenen ApoJ (s'ha de veure una banda específica a 40kDa en condicions reductores) (Figura 11.D). Finalment s'ajunta el volum de les fraccions eluïdes d'interès i es procedeix a la diàlisi per tal d'eliminar l'imidazole de la mostra.

La diàlisi es realitza amb H₂O desionitzada 10% PBS amb una membrana de diàlisi de 10 KDa Snake Skin Dialysis Tubing membranes (Thermo Fisher Scientific) durant tota la nit (ON, de l'anglès, *overnight*) a 4°C en agitació (Figura 11.E). A continuació, les mostres de rhApoJ s'han de concentrar unes 10x vegades. Aquest procés es du a terme amb un speed-vac (Thermo Fisher Scientific) centrifugant al buit a 35°C fins a quedar-nos amb un 10% del volum inicial.

2.3 Comprovació de la puresa i càlcul de la concentració

Finalment, per cada tanda de producció i purificació es comprova la puresa de rhApoJ de la solució realitzant una electroforesi i tinció amb Blue Coomassie (BlueSafe, NZYTech) (Figura 11.F) i es mesura la concentració realitzant un assaig de proteïna amb àcid bicinonínic (BCA) (Thermo Fisher Scientific). La puresa es calcula a partir de la banda del gel d'electroforesi amb el software Image J (NIH, Maryland, MD, USA). La rhApoJ amb una puresa >75% es considera adequada. Per tal de tenir la solució de tractament final, es dilueix a una concentració de 300 µg/mL amb PBS, d'alíquota i congela a -80°C fins al seu ús. Es pot detectar l'ApoJ humana obtinguda específicament utilitzant la tècnica de WB (Figura 11.G), tal i com explicarem en un apartat posterior.

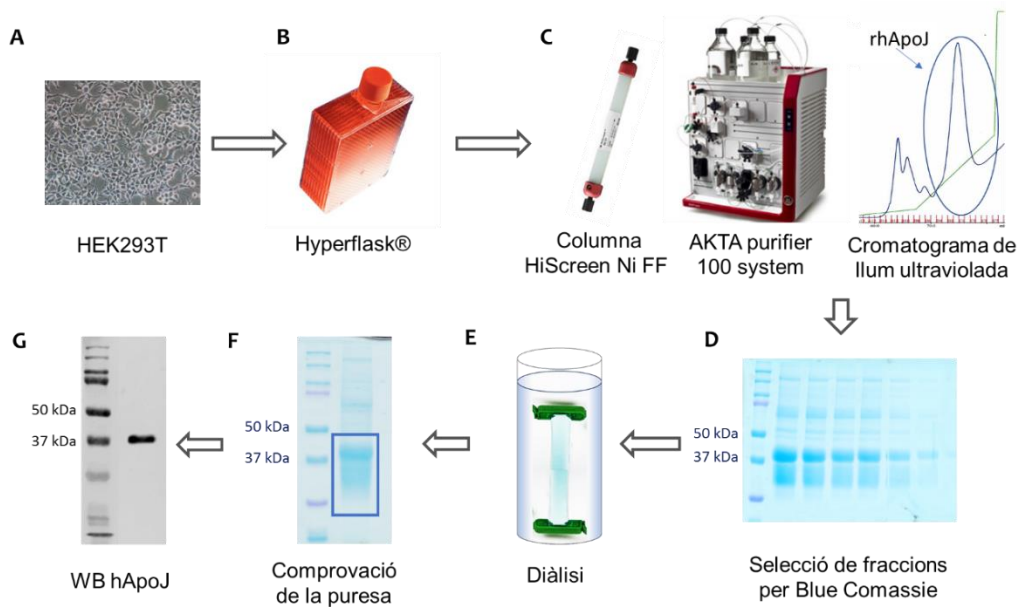


Figura 11. Resum gràfic de la producció i purificació de proteïna rhApoJ. A) Cultiu de cèl·lules embrionàries de ronyó humà transfectades (HEK293T). B) Cultiu de HEK293T en sistemes de Hyperflask®. C) Purificació de rhApoJ a partir del medi obtingut dels Hyperflask® utilitzant columnes HiScreen Ni FF en el sistema de purificació AKTA purifier 100 system. Representació del cromatograma de llum ultraviolada realitzat durant el procés d'elució, el pic encerclat correspon al pic específic de la rhApoJ. D) Visualització de les proteïnes contingudes a les diferents fraccions de l'elució mitjançant un gel d'acrilamida amb una tinció de Coomassie Blue. E) Diàlisi en 10 KDa Snake Skin Dialysis Tubing membranes amb 10% PBS. F) Comprovació de la puresa amb Blue Coomassie, el requadre assenyalava la part proteica de rhApoJ. G) Western Blot (WB) amb un anticòs contra ApoJ humana (hApoJ) per tal de detectar la proteïna específicament.

3. Estudi pre-clínic: tractament amb rhApoJ en el model de ratolí transgènic APP23

3.1 Línia de ratolins APP23

La línia de ratolins transgènics APP23 és un model animal que sobreexpressa la proteïna humana PPA amb la doble mutació sueca de MA familiar (KM670, 671NL), sota el control del promotor neuronal Thy-1 (B6.Cg-Tg (Thy1-APP) 3Somm/J)). La nostra colònia prové de ratolins mascles APP23 C57BL/6 inicialment adquirits a The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) creuats amb femelles WT C57BL/6 procedents de Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle,

França). El genotip de tots els animals es testa a Transnetyx (Cordova, TN, USA) amb petits talls de teixit (orella o cua).

Els animals es troben sempre en condicions d'establació adequades, amb menjar i beguda *ad libitum*, temperatura i humitat controlades i cicles de llum/fosc de 12 hores.

3.2 Administració in vivo de rhApoJ

Per aquesta tesi doctoral es van tractar dos grups d'animals amb rhApoJ per tal d'assolir l'objectiu 3 (Figura 12).

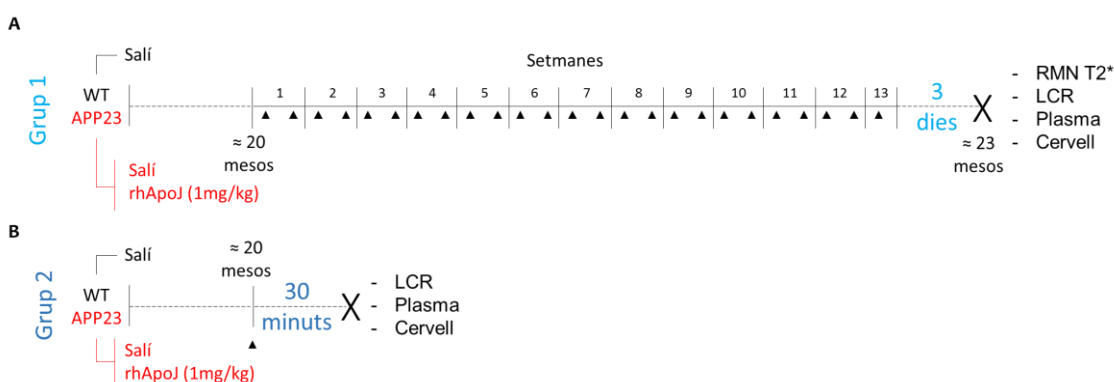


Figura 12. Disseny experimental de l'estudi 3 basat en el tractament in vivo amb rhApoJ en ratolins APP23 i WT. A) Grup 1, B) Grup 2. Els triangles negres representen cada administració intraperitoneal. Les creus representen el moment de l'eutanàsia.

El grup 1, consistia en femelles APP23 de 20 ± 0.5 mesos d'edat que van rebre 25 dosis intraperitoneals de rhApoJ (1 mg/kg) (n=9) o salí (n=8) durant 12 setmanes. Alhora, femelles WT emparellades per edat van rebre solució salina (n=13). Al finalitzar el tractament, es van eutanasiar els ratolins 3 dies després de la última dosi i després d'un període de dejú ON.

Es va tractar també el grup 2 que consistia de femelles APP23 de 19.6 ± 2.3 mesos d'edat i que van rebre 1 dosi intraperitoneal de rhApoJ (1 mg/kg) (n=4) o solució salina (n=3), i femelles WT emparellades per edat que van rebre salí (n=3). En aquest cas els animals es van eutanasiar 30 minuts després del tractament corresponent.

Tant l'administració del tractament com tots els anàlisi es van realitzar de manera cega. Durant el temps de tractament van morir 5 animals del grup 1 (2 WT salí, i 3 APP23 rhApoJ), sense poder detectar una associació estadística entre la mortalitat o pèrdua de pes i el tractament administrat. Tots els procediments realitzats van ser aprovats pel comitè ètic d'experimentació animal del VHIR així com el de la Universitat Autònoma de Barcelona i aprovat per la Generalitat de Catalunya (CEA-OH/10888/1) complint la legislació espanyola (RD 53/2013) i Directrius de la Unió Europea (86/609/EEC). El tractament es va dur a terme de febrer a abril del 2020.

3.3 Obtenció de mostres i preparació de teixits

Es van obtenir mostres de sang, líquid cefalorraquidi (LCR) i cervell de tots els animals inclosos a l'estudi.

Pels dos grups, en el moment de l'eutanàsia, es van anestesiar els ratolins amb inhalació d'isoflurà al 5% amb oxigen per obtenir LCR. Tal i com hem descrit prèviament (359), es van penetrar capil·lars de vidre de 0.5 mm de diàmetre a la dura mater de la cisterna Magna visualitzant-ho a través d'un microscopi. Només LCR totalment transparent es va considerar útil pels anàlisis posteriors. Seguidament, es van obtenir mostres de sang en tubs EDTA per punció intracardíaca, que es van centrifugar per tal d'obtenir les mostres de plasma.

En el grup 1, els animals es van perfondre amb punció intracardíaca amb 20 mL de solució salina seguit de 20 mL de paraformaldehid (PFA) 4% a 4°C i es van extreure els cervells ràpidament per submergir-los en PFA 4% a 4°C. Passades 72 hores, es van transferir els cervells fixats en PBS a una solució al 0.01% d'Azida sòdica (Sigma-Aldrich) per un mínim de 10 dies per estabilitzar el teixit i poder realitzar la RMN *ex vivo*. Després de l'adquisició de les RMN, els cervells es van submergir en formalina 10% durant 12 hores i es van incrustar en blocs de parafina a la Unitat d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Pel grup 2, després de l'extracció de LCR i sang es va perfondre amb 20 mL de solució salina a 4°C. Es van extreure els cervells i l'hemisferi dret es va congelar ràpidament (*snap-frozen* en anglès) en nitrogen líquid per emmagatzemar-los posteriorment a -80°C; l'hemisferi

esquerre es va submergir en formalina 10% durant 72 hores fins incrustar-lo en blocs de parafina. La preparació dels blocs de parafina va ser duta a terme per la Unitat d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

3.4 RMN cerebral ex vivo

Es va realitzar una RMN cerebral *ex vivo* en animals del grup 1. La RMN es va fer un sistema magnètic horitzontal (7T, BioSpec 70/30USR, Bruker, Ettlingen, Alemanya) i es van obtenir imatges ponderades en T2*. Per realitzar la RMN *ex vivo* es van submergir els cervells en Galden® D05 PFPE (Solvay, Bollate, Itàlia), un dissolvent fluorat que redueix l'aparició d'artefactes i es van introduir en un suport fet manualment a mida per cada cervell. Les RMN es van dur a terme al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear a la Universitat Autònoma de Barcelona amb el software Paravision (Bruker). Els paràmetres d'imatge utilitzats van ser: temps de repetició 700 ms, temps d'eco 8 ms, matriu 160 x 160, camp de visió (*field of view* en anglès) 1.28 x 1.28 cm², gruix dels talls 0.3 mm, i 28 talls. El temps d'adquisició total per un vòxel de mida 0.08x0.08x0.3 mm³ va ser de 22 minuts.

Les senyals hipointenses en T2* van ser considerades lesions hemorràgiques i es van classificar com microsagnats (50-300 µm de diàmetre) o hemorràgies més grans (>300 µm) tal i com havia estat descrit prèviament pel model APP23 (248). Es van comptar les lesions hemorràgiques visualment, considerant només les senyals hipointenses en T2* esfèriques i tenint en consideració l'anatomia cerebral del ratolí amb l'ajuda de l'atles interactiu *Allen Brain Reference Atlases* (<https://atlas.brain-map.org/>). Les senyals considerades artefactes o estructures anatòmiques es van descartar. Per evitar comptar la mateixa lesió hemorràgica múltiples vegades, la seva presència va ser curosament controlada en els talls consecutius. A més, també es van classificar les lesions hemorràgiques segons la seva localització com lobars (còrtex) o profundes (tàlem i ganglis basals). El volum de les lesions hemorràgiques va ser quantificat utilitzant el software Image J (NIH).

3.5 Homogenats cerebrals

L'hemisferi cerebral dret del grup 2 es va homogeneïtzar en un homogeneïtzador amb tampó de sucrosa en fred (0.32 M of sucrosa (Sigma-Aldrich) i 5 mM Hepes (Thermo Fisher Scientific)). Seguidament es va afegir el doble de volum del buffer de lisi RIPA amb inhibidors de proteases i fosfatases i es va centrifugar 15 minuts a 15000g a 4°C. El sobrenedant resultant es va considerar l'homogenat de cervell final i es va congelar a -80°C fins al seu ús. La concentració de proteïna dels homogenats es va determinar amb el kit d'assaig de proteïnes BCA (Thermo Fisher Scientific).

4. Mètodes generals

4.1 Tincions de teixit cerebral

Totes les tincions es van dur a terme en seccions cerebrals sagitals de 4 µm de gruix incrustats en parafina dels ratolins utilitzats en el tercer estudi. Les seccions per cada tinció s'obtenien a partir de la mateixa profunditat partint de la línia mitja del cervell i sempre contenint tant estructures d'hipocamp com d'estriat. En tots els casos es van desparafinar les mostres incubant-les 1 hora a 60°C i es van submergir en xilè 6 minuts. Tot seguit es van rehidratar (passant per 100% etanol (etOH), 96% etOH, 70% etOH i 50% etOH diluït amb H₂O) abans de procedir amb la tinció.

4.1.1 Tinció amb Thioflavina S (ThS)

La Thioflavina S (ThS) s'uneix a dipòsits d'Aβ fibril·lars amb estructura de fulles β emetent fluorescència de 428 nm. Per tal de realitzar la tinció, després de rehidratar les mostres, van ser submergides en una solució de ThS 1% (Sigma-Aldrich) diluïda en etanol 75% durant 30 segons, seguit de la incubació en ThS 0.5% durant 1 minut. A continuació es van fer 2 rentats amb 75% etOH. Finalment es van deshidratar les seccions i es van muntar en medi de muntatge amb 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) per tenyir els nuclis cel·lulars (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

4.1.2 Tinció amb resorufina

La resorufina permet fer una tinció específica de dipòsits d'A β vasculars emetent una fluorescència de 584 nm (121). Un cop rehidratades les seccions, es van rentar amb PBS i permeabilitzar amb PBS amb 0.2% Tritó (PBST). Seguidament es van submergir en una solució de resorufina 1 mM (Sigma-Aldrich) durant 5 minuts i, seguidament, es van fer rentats primer amb PBS i seguidament amb PBS amb 50% etOH. Per acabar, es van deshidratar les seccions i es van muntar amb el medi de muntatge amb DAPI (Vector Laboratories).

4.1.3 Immunohistoquímica (IHQ)

En aquesta tesi doctoral es va utilitzar la tècnica de tinció immunohistoquímica per detectar de manera específica A β ₄₀ i CD68. Després de desparafinar i hidratar les seccions, es va dur a terme la recuperació d'antígens del teixit (*antigen retrieval* en anglès) incubant les mostres amb tampó citrat (10mM de citrat de sodi amb 0.05% de Tween20, pH=6) a 95°C durant 30 minuts. Seguidament, es va procedir al bloqueig de les seccions durant 1 hora a RT. Per tal de detectar l'A β ₄₀ a les mostres, el tampó de bloqueig va consistir en solució salina tamponada amb Tris (TBS, de l'anglès, *Tris Buffer Saline*) amb 1.5% de glicina 10% de FBS i 0.2% de TBS amb 1% Tween20. El tampó de bloqueig per la IHQ per detectar CD68 va consistir en 10% de sèrum de cabra i 1% d'albumina de sèrum boví (BSA, de l'anglès, *Bovine Serum Albumin*) diluït en PBS 0.1% Tween20. Després del bloqueig, les seccions es van incubar ON a 4°C amb l'anticòs primari corresponent diluït en tampó de bloqueig: anticòs policlonal de conill anti-A β ₄₀ (1:5000, #AB5074P, Millipore, Temecula, CA, USA) i anticòs policlonal de conill anti-CD68 (1:5000, #ab125212, Abcam, Cambridge, UK). L'endemà es van bloquejar les peroxidases endògenes amb 1% de peròxid d'hidrogen durant 15 minuts. A continuació, les seccions es van incubar amb l'anticòs secundari biotinitat anti-Immunoglobulina G (IgG) de conill (anti-IgG conill) diluït en tampó de bloqueig (1:1000, Vector Laboratories) durant 1 hora a RT. Seguidament es van incubar les seccions 1 hora a RT amb estreptavidina conjugada amb peroxidasa (HRP, de l'anglès, *streptavidin-horseradish peroxidase*, 1:1000, Vector Laboratories). Per procedir al revelat, es van incubar les seccions durant 15

segons amb diaminobenzidina (DAB; Dako, Glostrup, Dinamarca). Finalment es van submergir durant 20 segons en solució d'hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) com a tinció de contrast, es van deshidratar i muntar amb Dibutilftalat Poliestirè Xilè (DPX, Sigma-Aldrich). Com a control negatiu de l'assaig, es va realitzar el mateix procediment sense incubar les seccions control amb l'anticòs primari. Els anticossos utilitzats es mostren a la Taula 2.

Taula 2. Anticossos per IHQ.

Diana	Espècie hoste	Dilució	Proveïdor
<i>Anticossos primaris</i>			
A β ₄₀	Conill	1:5000	Millipore
CD68	Conill	1:5000	Abcam
<i>Anticòs secundari</i>			
IgG conill	Cabra	1:1000	Vector Laboratories

4.1.4 Immunofluorescència (IF)

En aquesta tesi doctoral es va utilitzar la tècnica d'immunofluorescència per detectar de manera específica les proteïnes Iba1 i ApoJ humana.

Un cop hidratats, els talls es van incubar amb tampó citrat (10 mM de citrat de sodi amb 0.05% de Tween20 i pH=6) durant 30 minuts a 95°C per desemmascarar els antigens específics del teixit. Seguidament es va fer 1 hora de bloqueig a RT amb 10% de FBS diluït en PBS 0.1% Tween20, i es van incubar les seccions ON a 4°C amb els anticossos primaris diluïts en tampó de bloqueig: anticòs de conill anti-Iba1 (1:200, #ab178847, Abcam) i anticòs de cabra anti-hApoJ (1:50, #ab39991, Abcam). L'endemà, les seccions es van incubar amb l'anticòs secundari pertinent diluït en tampó de bloqueig durant 1 hora a RT: anti-IgG-488 conill per Iba1 (1:500, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) i anti-IgG-488 cabra per ApoJ humana (1:500, Invitrogen). Finalment es van deshidratar les seccions i es van muntar amb medi de muntatge amb DAPI (Vector Laboratories). Com a control negatiu de l'assaig, es va realitzar el mateix procediment sense incubar les seccions control amb l'anticòs primari. Els anticossos utilitzats es mostren a la Taula 3.

Taula 3. Anticossos per IF.

Diana	Espècie hoste	Dilució	Proveïdor
<i>Anticossos primaris</i>			
Iba1	Conill	1:200	Abcam
ApoJ humana	Cabra	1:50	Abcam
<i>Anticòs secundari</i>			
IgG conill	Cabra	1:500	Invitrogen
IgG cabra	Conill	1:500	Invitrogen

4.1.5 Visualització i quantificació de les tincions

Es van obtenir imatges de totes les seccions que havien estat processades amb l'escàner Panoramic 250 (3DHitech, Budapest, Hongria). Les imatges es van obtenir amb un objectiu 20X i es van digitalitzar amb el programa Case Viewer (3DHitech). Posteriorment, es van realitzar els anàlisis quantitius amb el software Image J (NIH). En tots els casos es va delimitar la regió d'interès del cervell (còrtex, hipocamp, tàlem o tot el cervell excepte bulb olfatori i cerebel) i es va mesurar l'àrea. El número de partícules positives es va quantificar ajustant un llindar per cada tinció i es va dividir per l'àrea (# dipòsits / àrea (μm^2)), també es va calcular el % d'àrea positiva i la mida mitja dels dipòsits. El comptatge de vasos positius es va determinar manualment en les tincions de ThS, resorufina i IHQ d'A β_{40} .

4.2 Electroforesi i Western Blot

L'electroforesi i Western Blot (WB) es van dur a terme pels processos de comprovació de producció i purificació de rhApoJ.

En tots els casos, es va realitzar una electroforesi SDS-PAGE al 10% en condicions reductores. Les mostres es van preparar amb *Loading Buffer* 1X (Laemmli Sample Buffer, BioRad) amb un 5% de 2-Mercaptoethanol (98%, Sigma-Aldrich) i es van incubar a 95°C durant 5 minuts. Seguidament es van carregar les mostres al gel de poliacrilamida i es va realitzar l'electroforesi a 120 V.

Per tal de visualitzar les bandes de proteïna al gel, després de l'electroforesi, es va submergir el gel 2 hores en la tinció de Blue Coomassie (BlueSafe, NZYTech) i es van realitzar 3 rentats de 10 minuts amb H₂O.

Quan va caldre realitzar la tècnica WB, es va fer una transferència del gel a membrana de nitrocel·lulosa utilitzant el sistema de transferència Trans-Blot Turbo (BioRad). Es va visualitzar la presència de proteïnes a la membrana amb un tinció de roig Ponceau (Sigma-Aldrich) durant 10 segons, i seguidament es va procedir al bloqueig de la membrana amb 10% de llet desnatada en PBST durant 1 hora a RT en agitació. La membrana es va incubar ON a 4°C i en agitació amb un anticòs de ratolí anti-ApoJ humana (BD Pharmigen, Franklin Lakes, New Jersey, USA) diluït 1:500 en solució de bloqueig. L'endemà, es va procedir a la incubació durant 1 hora a RT amb l'anticòs secundari anti-IgGratolí (1:5000, Sigma-Aldrich) conjugat amb HRP, seguida de 3 rentats de 10 minuts amb PBST. Finalment es van visualitzar les bandes del WB per quimioluminescència amb el kit *Pierce ECL Western Blotting Lumino Enhancer y Stable Peroxidase* (Thermo Fisher Scientific) utilitzant el sistema d'imatge Odyssey® Fc (Li-Cor Biosciences, USA) (Figura 11.G).

4.3 ELISAs simples i multiplex

En aquesta tesi doctoral es van realitzar ELISAs (de l'anglès, *enzyme-linked immunosorbent assay*) tant simples per una sola proteïna com de més d'una proteïna (multiplex). En tots els casos es van utilitzar kits comercials.

Es va utilitzar ELISA per detectar ApoJ en plasma humà i en les fraccions de lipoproteïnes en els estudis 1 i 2 amb un ELISA de Mabtech ((#3713-1HP-1). Aquest mateix ELISA també es va utilitzar per detectar la proteïna ApoJ recombinant humana al plasma dels animals en l'estudi 3.

La quantificació d'Aβ₄₀ en LCR de ratolins es va dur a terme amb l'ELISA #KHB3481 d'Invitrogen.

Per mesurar els nivells de marcadors d'inflamació i MMPs es van avaluar mostres de plasma dels ratolins inclosos en el tercer estudi amb ELISAs multiplex i es van quantificar les següents molècules: Groα, Il-1β, IL-17A,

MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 α , MMP-2, MMP-3, MMP-8, proMMP-9, MMP-12 ((#EPX080-20832-901, Thermo Fisher Scientific; #MMMP1MAG-79K i #MMMP2MAG-79K, Merck, Darmstadt, Alemanya).

Els nivells de MMP-12 en mostres de plasma humà del tercer estudi es van avaluar amb el kit #EH327RB de Thermo Fisher Scientific.

Totes les mostres excepte el LCR es van avaluar per duplicat i es va utilitzar la mitja pels anàlisis estadístics. Es van considerar els duplicats amb un coeficient de variació < 20%.

5. Anàlisi estadístic

Tot i que hi ha variacions dins l'anàlisi estadístic de cada estudi, en tots els casos es van seguir els mateixos principis explicats a continuació.

Les associacions de les variables categòriques es van estudiar amb taules de contingència i un test Chi-quadrat obtenint un p valor de Pearson o de Fisher de manera corresponent. Els p valors obtinguts del test Chi-quadrat es van ajustar utilitzant el test de Bonferroni en casos on es feien comparacions múltiples entre més de dos grups (estudi 1).

La distribució de les variables contínues es va analitzar amb el test de Kolmogorov-Smirnov en casos on la mostra era gran (estudis 1 i 2) i el test de Shapiro-Wilk en mostres petites (estudi 3). En cas que la distribució fos normal es va realitzar un t-test de mostres independents o ANOVA amb correccions múltiples per Bonferroni segons pertogués. En el cas que la distribució de les variables fos no normal, es va realitzar un Mann Whitney U test de mostres independents o un Kruskal-Wallis ajustant per comparacions múltiples per Dunn-Bonferroni.

Per estudiar l'associació entre 2 variables contínues o una variable contínua amb una variable categòrica ordinal de més de 2 categories es van utilitzar correlacions. En cas que la distribució de les dues variables fos normal es va utilitzar la correlació de Pearson i el coeficient R. En cas que una de les variables fos no normal o categòrica es va utilitzar la correlació de Spearman amb el coeficient de Rho.

També es van realitzar diverses regressions. En el cas de regressions logístiques es van dur a terme regressions logístiques binàries *Forward LR* on s'expressava la odds ratio (OR) amb un 95% d'interval de confiança (CI). En els casos de regressions linears es van dur a terme de forma *backward* i es va expressar la pendent de regressió (B) amb un 95% de CI.

Per l'estudi 2, es va haver de fer un anàlisi estadístic dels SNPs, dissecionant cada SNP en el seus dos al·lels per tal de fer un test al·lèlic. Primer es va fer un test de Chi quadrat i després es van ajustar els resultats per sexe, edat i els diferents SNPs associats amb cada variable radiològica realitzant regressions logístiques binàries (*Forward LR*). Aquest tipus de regressió es va dur a terme seguint dos models: o bé el model dominant comú que utilitza cada SNP com una variable categòrica binària (tenir l'al·lel minoritari versus no tenir-lo), o el model additiu que compara els tres possibles genotips.

En tots els casos les dades estan expressades com mitjana \pm desviació estàndard (SD) per les distribucions normals i mediana [rang interquartílic] per les distribucions no normals. Es va considerar significatiu un p valor per sota de 0.05, i una tendència estadística un p valor per sota de 0.1. Els anàlisi estadístics es van dur a terme utilitzant SPSS Statistics version 22.1 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) o Graphpad Prism 9 (Prism, Pleasant Hill, CA, USA).

Resultats



1. Association of candidate genetic variants and circulating levels of ApoE/ApoJ with common neuroimaging features of Cerebral Amyloid Angiopathy

Under review - 30.12.2022

Association of candidate genetic variants and circulating levels of ApoE/ApoJ with common neuroimaging features of Cerebral Amyloid Angiopathy

Anna Bonaterra-Pastra¹, Sònia Benítez^{2,16}, Olalla Pancorbo³, David Rodríguez-Luna³, Carla Vert⁴, Alex Rovira⁴, M. Mar Freijo⁵, Silvia Tur⁶, Maite Martínez-Zabaleta⁷, Pere Cardona Portela⁸, Rocío Vera⁹, Lucía Lebrato-Hernández¹⁰, Juan F. Arenillas¹¹, Soledad Pérez-Sánchez¹², Ana Domínguez-Mayoral¹², Joan Martí Fàbregas¹³, Gerard Mauri¹⁴, Joan Montaner^{1,15}, Jose Luis Sánchez-Quesada^{2,16*}, and Mar Hernández-Guillamon^{1*}.

¹ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

² Cardiovascular Biochemistry Group, Research Institute of the Hospital de Sant Pau (IIB Sant Pau) Barcelona, Spain.

³ Stroke Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain.

⁴ Section of Neuroradiology, Department of Radiology, Vall d'Hebron University Hospital, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona

⁵ Neurovascular group, Biocruces Health Research Institute, Barakaldo, Spain.

⁶ Neurology, Son Espases University Hospital, Balearic Islands, Spain.

⁷ Department of Neurology, Donostia University Hospital, San Sebastián, Spain.

⁸ Department of Neurology, Bellvitge University Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

⁹ Stroke Unit-Department of Neurology, Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, Spain.

¹⁰ Stroke Unit, Virgen del Rocío University Hospital, Sevilla, Spain.

¹¹ Stroke Program, Department of Neurology, Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain. Clinical Neurosciences Research Group, Department of Medicine, University of Valladolid, Spain.

¹² Department of Neurology, Virgen Macarena University Hospital, Sevilla, Spain.

¹³ Stroke Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

¹⁴ Stroke Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Lleida, Spain.

¹⁵ Stroke Research Program, Institute of Biomedicine of Sevilla, IBI-S/Virgen del Rocío University Hospital/ University of Sevilla & Department of Neurology, Virgen Macarena University Hospital, Sevilla, Spain.

¹⁶ CIBERDEM, ISCIII, Spain.

*Correspondence: M.H-G. mar.hernandez.guillamon@vhir.org; J.L.S-Q. jsanchezq@santpau.cat

Abstract

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is characterized by the accumulation of amyloid- β (A β) in brain vessels and is a main cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) in the elderly. CAA is associated with magnetic resonance imaging (MRI) markers of small vessel disease (SVD). Since A β is also accumulated in Alzheimer's disease (AD) in the brain parenchyma, we aimed to study if several single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with AD were also associated with CAA pathology. Furthermore, we also studied the influence of APOE and CLU genetic variants in Apolipoprotein E (ApoE) and Clusterin/Apolipoprotein J (ApoJ) circulating levels and their distribution among lipoproteins. The study was carried out in a multicentric cohort of 126 patients with lobar ICH and clinical suspicion of CAA. We observed several SNPs associated with CAA neuroimaging MRI markers (cortical superficial siderosis (cSS), enlarged perivascular spaces in the centrum semiovale (CSO-EPVS), lobar cerebral microbleeds (CMB), white matter hyperintensities (WMH), corticosubcortical atrophy and CAA-SVD burden score). Concretely, ABCA7 (rs3764650), CLU (rs9331896 and rs933188), EPHA1 (rs11767557), and TREML2 (rs3747742) were significantly associated with a CAA-SVD burden score. Regarding circulating levels of apolipoproteins, protective AD SNPs of CLU (rs11136000 (T) and rs9331896 (C)) were significantly associated with higher HDL ApoJ content in the lobar ICH cohort. APOE ϵ 2 carriers presented higher plasma and LDL-associated ApoE levels whereas APOE ϵ 4 carriers presented lower plasma ApoE levels. Additionally, we observed that lower circulating ApoJ and ApoE levels were significantly associated with CAA-related MRI markers. More specifically, lower LDL-associated ApoJ and plasma and HDL-associated ApoE levels were significantly associated with CSO-EPVS, lower ApoJ content in HDL with brain atrophy and lower ApoE content in LDL with the extent of cSS. This study reinforces the relevance of lipid metabolism in CAA and cerebrovascular functionality. We propose that ApoJ and ApoE distribution among lipoproteins may be associated with pathological features related to CAA with higher ApoE and ApoJ levels in HDL possibly enhancing atheroprotective, antioxidative and anti-inflammatory responses in cerebral β -amyloidosis.

Introduction

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is a degenerative small vessel disease (SVD) caused by the deposition of amyloid, commonly amyloid- β (A β), in the wall of the blood vessels

of the central nervous system, affecting leptomeningeal vessels, arteries and cortical arterioles of medium or small caliber, as well as cerebral capillaries (Charidimou et al., 2017a). The most relevant pathological consequence of CAA is the presence of intracerebral hemorrhage (ICH) in cortical and subcortical localization with ICH recurrence being a common complication of this disease (Charidimou et al., 2017d). Cognitive deterioration, dementia and transient focal neurologic episodes (TFNE) are also relevant clinical manifestations of CAA (Arvanitakis et al., 2011; Smith et al., 2021). Symptomatic CAA is characteristically associated with MRI markers of small vessel brain injury, including hemorrhagic markers as lobar cerebral microbleeds (CMB) and cortical superficial siderosis (cSS) (Charidimou et al., 2017c, 2017d), but also non-hemorrhagic features of SVD, such as enlarged perivascular spaces in the centrum semiovale (CSO-EPVS) (Charidimou et al., 2017b) and periventricular white matter hyperintensities (WMH) (Chojdak-Lukasiewicz et al., 2021). These imaging features together with clinical characteristics are currently used to diagnose patients as possible or probable CAA according to the modified Boston criteria (Linn et al., 2010), which have recently been validated and updated (Charidimou et al., 2022). In parallel, a small vessel disease score obtained from some of these common CAA MRI features, previously validated and associated with pathological CAA, has been defined to predict the vascular affection degree in this disease (Charidimou et al., 2016; Boulouis et al., 2017).

Pathologically, CAA frequently coexists with Alzheimer's disease (AD), where A β is accumulated in the brain parenchyma forming insoluble plaques. Therefore, both CAA and AD are grouped as cerebral β -amyloidosis diseases. In addition, AD brains present neurofibrillary tangles (NFT) formed by insoluble hyperphosphorylated Tau, that together with the presence of A β plaques induce neurodegenerative processes causing dementia (Scheltens et al., 2021). Besides the biological overlap between AD and CAA, based on A β production and clearance processes, different factors are described to favor the A β accumulation in different brain localizations (Greenberg et al., 2020). For example, the length of the peptide is clearly related to its deposition: A β 42 is the main component of amyloid plaques in AD, whereas A β 40 is predominantly aggregated in blood vessels (Yamada, 2015). Apolipoprotein E (ApoE), which has the main function of regulating lipids transport and distribution in the brain (Bu, 2010), is also a crucial element associated with A β brain deposition. This last assumption is based on the fact that the ϵ 4 variant of the APOE gene is the main genetic risk factor for AD (Schmechel et al., 1993),

but also for CAA (Greenberg et al., 1996). Indeed, APOE ϵ 4 is related not only to CAA but also to lobar ICH and lobar microhemorrhages, characteristic traits in CAA patients (Inoue et al., 2021). On the other hand, the APOE ϵ 2 variant is more frequent in brains with more severe vascular changes and it is associated with the presence and recurrence of ICH attributed to CAA (Greenberg et al., 1998). However, while both APOE ϵ 2 and APOE ϵ 4 alleles are considered risk factors for ICH-CAA (Giralt-Steinhauer et al., 2022), APOE ϵ 2 is a protective factor for AD (Serrano-Pozo et al., 2021). On the other hand, apolipoprotein J (ApoJ) or clusterin (Clu) coded by the CLU gene, is the second most expressed apolipoprotein in the brain after ApoE. Both ApoE and ApoJ are important factors in lipid metabolism that can also modulate A β aggregation and deposition in the brain (Huynh et al., 2017; Foster et al., 2019). The distribution of these apolipoproteins among different plasma lipoproteins can play a role in their functionality (Koch and Jensen, 2016; Lanfranco et al., 2020). In this regard, we have previously described how the content of ApoE and ApoJ in lipoproteins differs between CAA-ICH and AD patients (Bonaterra-Pastra et al., 2021).

To further understand the rationale underlying cerebral β -amyloidosis and the biological relationship between CAA and AD, our study was based on the determination of the frequency of different genetic variants previously associated with AD pathology in a cohort of patients with lobar ICH associated with CAA. In this sense, candidate single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected for being previously associated with AD occurrence and progression in different GWAs studies, including genetic variants in APOE, CLU, ABCA7, PICALM, BIN1, SORL1, PTK2B, EPHA1, CD33, CD2AP, MS4A6A, HLA-DRB5/HLA-DRB1, TREM1, TREM2 and TREML2 genes (Lambert, 2013; Replogle et al., 2015). These genes are assumed to be associated with AD through different pathways. For example, SORL1, ABCA7 and CLU participate in cholesterol metabolism (Giri et al., 2016). BIN1, CD2AP, PICALM, EPHA1 and SORL1 are implicated in endocytosis which plays a major role in synaptic transmission and response to neural damage (Giri et al., 2016); PTK2B has been related to hippocampal synaptic function (Giri et al., 2016); and CR1, CD33, MS4A, ABCA7, EPHA1, TREM2, TREM1, TREML2, HLA-DRB5/HLA-DRB1 and CLU are involved in immune response (Replogle et al., 2015; Giri et al., 2016). In particular, we focused on the potential associations of candidate SNPs frequency with the most common MRI markers associated with CAA in the lobar ICH cohort. Furthermore, because of the particular role of ApoE and ApoJ in cerebral β -

amyloidosis, we also analyzed the association of the levels of total plasma ApoE and ApoJ proteins, as well as their content in different circulating lipoproteins, with the genetic variants in APOE and CLU genes and with the most common MRI markers associated with CAA.

Methods

Study Population

The population studied in this cohort consisted of 126 participants who had suffered at least one lobar intracerebral hemorrhage (ICH) and presented a clinical suspicion of CAA. Patients were recruited during a follow-up visit in 11 different Spanish centers (Bonaterra-Pastra et al., 2021; Marazuela et al., 2021). All patients were >55 years old and those presenting with symptomatic deep intracerebral hemorrhages or treated with anticoagulant therapy were excluded.

The data obtained from the cohort included the recruitment date, date of stroke events, demographic characteristics (sex, age), relevant vascular risk factors (hypertension (HT), diabetes mellitus (DM), and dyslipidemia (DL)), medication and cognitive status. Patients that presented mild cognitive impairment or dementia were all considered as cognitive impaired patients. The study was approved by the Clinical Investigation Ethical Committee of the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain (PR(AG)326/2014) and had the approval of the Ethical Committees of all the participating centers. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Magnetic resonance imaging evaluation

Brain magnetic resonance imaging (MRI) was acquired using a 1.5-T whole-body scanner for most patients (n=118, 96%) for diagnostic and clinical purposes in each center at 6.70 ± 16.79 months from the last lobar ICH. The following sequences were obtained: axial T2-weighted turbo spin-echo, axial T1-weighted spin-echo, axial T2-weighted turbo fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), and axial T2*-weighted echo-planar gradient-echo sequence. All MRI images were evaluated in Vall d'Hebron University Hospital (VHUH) by the same neuroradiologist, who was blinded to clinical and biological information.

ICHs were defined as hypointense foci >5 mm in diameter on the T2*-weighted images, and the number and location were recorded. Cortical superficial siderosis (cSS) was

defined as the presence of thin hypointensity on T2*-weighted in a curvilinear pattern following the gyral cortical surface and was evaluated and classified as focal (restricted to ≤ 3 sulci) or disseminated (≥ 4 sulci) according to its distribution and severity as previously described (Linn et al., 2010). cSS contiguous or potentially anatomically connected with any lobar ICH were not included in the aforementioned categories. Perivascular spaces (PVS) also known as Virchow-Robin spaces were evaluated on axial T2-weighted images. Enlarged perivascular spaces (EPVS) in the basal ganglia (BG) or centrum semiovale (CSO) were rated using a previously described validated 4-point visual rating scale (0= no EPVS, 1= 10 EPVS, 2= 11–20 EPVS, 3= 21–40 EPVS and 4> 40 EPVS) (Wardlaw et al., 2013). EPVS were also classified as low (≤ 20 EPVS) or high (≥ 21 EPVS) degree. The presence of cerebral microbleeds (CMB; diameter < 5 mm), together with their number and location, was recorded following the Brain Observer MicroBleed Scale (BOMBS) (Cordonnier et al., 2009). Depending on the number of lobar microbleeds, patients were classified as having less than 5 lobar CMB or more than 5 (Lobar CMB > 5). White matter hyperintensities (WMH) were defined as hyperintense signal lesions in T2-FLAIR or T2-weighted images and were classified as deep or periventricular depending on their location. Deep and periventricular WMH were assessed according to the four-point Fazekas rating scale (Fazekas et al., 1987). For periventricular WMH: 0= absence, 1= "caps" or pencil-thin lining, 2= smooth "halo", 3= irregular WMH extending into the deep white matter; and for deep WMH: 0= absence, 1= punctate foci, 2= beginning confluence of foci, 3 = large confluent areas. We further classified WMH burden as mild (Fazekas: 0, 1) or severe (Fazekas: 2,3). The WMH score was evaluated in the hemisphere not affected by hemorrhage, except in cases when both hemispheres were involved. Global brain atrophy was visually assessed and classified as mild, moderate or severe. The MRI analysis allowed the classification of cases according to Boston criteria 1.5 (Linn et al., 2010); 106 patients accomplished a CAA diagnosis, whereas 13 patients presented mixed-pathology (presenting lobar and deep microbleeds), 7 patients were excluded from the Boston criteria classification because of missing imaging information and 1 patient was diagnosed as probable CAA with supporting pathology. In addition, all patients were classified according to the CAA-small vessel disease (SVD) burden score (Charidimou et al., 2016). It ranges from 0 to 6 points and it is based on the presence and grade of MRI markers associated with CAA including CMBs, cSS, CSO- EPVS and WMH. In our study, the CAA-SVD burden was classified as low (≤ 3) or high degree (≥ 4).

Blood collection

Ten ml of blood in EDTA-containing Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) were collected from each participant at a follow-up visit. Blood was centrifuged at 4 °C for 15 min at 2500 rpm and plasma was immediately aliquoted and frozen at -80°C.

Genetic determinations

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) candidates were genotyped from blood using SNPlex™ at the Spanish National Genotyping Centre (CEGEN) and included rs6656401 and rs6701713 of CR1, rs4311 of ACE, rs11136000, rs7012010, rs9331896 and rs9331888 of CLU, rs4147929 and rs3764650 of ABCA7, rs3851179 and rs10792832 of PICALM, rs744373 and rs6733839 of BIN1 gene, rs11767557 and rs11771145 of EPHA1, rs3865444 of CD33, rs9349407 and rs10948363 of CD2AP, rs11218343 of SORL1, rs9271192 of HLA-DRB5-DRB1 region, rs28834970 of PTK2B, rs6910730 of TREM1, rs75932628 of TREM2, rs3747742 and of TREML2, and rs4938933 and rs983392 of MS4A6A and rs429358 y rs7412 of the APOE gene to determine APOEε genotype.

Plasma ApoE and ApoJ levels

Apolipoproteins levels determination in plasma and in lipoprotein fractions was done in a representative subcohort of 60 lobar ICH patients with clinical suspicion of CAA. The lipoprotein fractions determined were very low-density lipoproteins (VLDL), low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL). Blood samples from this group were obtained 10.42 ± 16.77 months after the last ICH and processed as previously explained. The standard lipid profile was quantified in the Clinical Biochemistry Unit of the Vall d'Hebron University Hospital (VHUH) using a direct HDL-cholesterol method (HDL-C plus) or by ultracentrifugation when the triglycerides concentration was higher than 3 mmol/L, in agreement with the National Cholesterol Education Program (Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report., 2002). These determinations were performed in an AU 5800 autoanalyzer (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) using reagents from Beckman Coulter. To study the apolipoprotein content in the lipoprotein fractions, lipoproteins were isolated by flotation sequential ultracentrifugation according to density: VLDL (1.006–1.019 g/mL), LDL (1.019–1.063 g/mL), and HDL (1.063–1.210 g/mL) in the Research Institute of the Hospital de Sant

Pau. ApoE determination was determined in a Cobas 6000/c501 autoanalyzer using reagents from Kamiya Biomedicals (Seattle, WA, USA). ApoJ quantification, in plasma and lipoproteins, was analyzed by ELISA (Mabtech, Stockholm, Sweden) at VHIR. Before ELISA quantification, lipoprotein samples were diluted to the same cholesterol concentration. Samples with null values for a particular quantification were discarded from such analysis.

Statistical Analysis

To study allelic associations, each SNP was dissected into its 2 alleles to perform an allelic test. The association of all the SNPs and demographic variables with CAA neuroimaging features was studied by raw analysis using contingency tables and a χ^2 test using the Pearson or Fisher p-value as needed. To adjust the results, a forward LR binary logistic regression using sex, age, and the significant SNPs for each radiological feature was assessed. The odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for the effect on radiological characteristics were estimated using binary logistic regression analysis. This regression was performed as a common dominant model using SNPs as binary categorical variables (not having the minor allele (MA) versus having the minor allele) or as an additive model (comparing the 3 different genotypes). For the binary logistic regression of the small vessel disease burden, a simplified score of low-high small vessel disease burden score was used. The distribution of the continuous variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. If the distribution was normal, an independent samples t-test was performed, and if the distribution was not normal an independent samples Mann-Whitney U test. When analyzing the association between apolipoprotein levels and age or ordinal variables with more than 2 categories, Spearman correlations were performed. Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for normal distributions or as the median [interquartile range] for non-normal distributions. To adjust our results, backward linear regressions were performed for ApoJ and ApoE circulating levels using the significant variables for each apolipoprotein fraction and adjusting by sex and age. The slope of the regression (B) with a 95% CI was estimated by linear regressions. A p-value below 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using SPSS Statistics version 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

The demographic characteristics of the study population are displayed in Table 1. All patients presented at least one lobar ICH, 30.2% of patients presented 2 or more lobar ICH and 50.4% presented cognitive impairment. The most common MRI features previously associated with CAA were analyzed and resulted well represented in our cohort (Table 2). From them, 42.4% of patients presented cSS, 70% of whom displayed disseminated cSS. Almost all patients (92.4%) presented MRI-visible EPVS; 97.25% of them in the basal ganglia, mostly with low degree (80%), whereas 80.7% presented EPVS in the CSO, among them 48.9% with high degree. Also, 61.9% of the population presented CMB. Among them, most of the patients showed lobar CMBs (94.52%), including 36.23% that presented more than 20 lobar CMBs. Also, nearly the whole cohort (91.5%) presented WMH, both periventricular (89.8%) and deep (90.7%). Additionally, 37.3% of patients presented brain atrophy.

Table 1.

Lobar ICH (n=126)	
Age, years	76.18 ± 7.11
Sex (Females)	68 (54%)
HT	73 (60.3%)
DM	18 (15.5%)
DL	41 (36.9%)
Cognitive impairment	58 (50.4%)
Corticosubcortical ICH	126 (100%)
≥2	38 (30.2%)
≥3	13 (10.3%)

Table 1. Demographic and clinical characteristics. Data are expressed as n (%). ICH: Intracerebral Hemorrhage; HT: Hypertension; DM: Diabetes Mellitus; DL: Dyslipidemia.

The main aim of this study was to evaluate whether genetic variants described as AD risk factors were also related to CAA, especially focusing on imaging features associated with this pathology in patients with lobar ICH. To do so, associations between the frequency of the candidate SNPs and MRI features and demographic characteristics were considered through allelic univariant analysis (Supplemental Table 1). After applying a

binary logistic regression adjusted by age and sex, only the candidate SNPs that remained significantly associated with specific MRI features are presented in Table 3. We detected that several CLU SNPs were associated with MRI features associated with CAA, such as the presence of cSS, CSO-EPVS, lobar CMB, and both deep and periventricular WMH. In addition, specific SNPs in ABCA7 (rs3764650; $p=0.009$), CLU (rs9331888; $p=0.014$), EPHA1 (rs11767557; $p=0.010$), and TREML2 (rs3747742; $p=0.019$) were independently associated with the CAA-SVD burden score when the common dominant model was applied (Figure 1). Moreover, the variants in ABCA7 (rs3764650; $p=0.013$), CLU (rs9331896; $p=0.018$), EPHA1 (rs11767557; $p=0.006$) and TREML2 (rs3747742; $p=0.033$) were also independently associated with the CAA-SVD burden score when the additive model was applied (Supplemental Figure 1). The minor alleles in the specific SNPs of ABCA7 (rs3764650 (G)), EPHA1 (rs11767557 (C)) and CLU (rs9331896 (C)) resulted to act as potential protective factors as their frequency significantly decreased at higher CAA-SVD score. On the other hand, the minor alleles in the specific SNPs of CLU (rs9331888 (G)) and TREML2 (rs3747742 (C)) were considered a risk factor, since their frequency was significantly correlated with a higher CAA-SVD score (Table 3). Interestingly, carriers of APOE ϵ 2 showed a statistical tendency to present a higher CAA-SVD burden score (Supplemental Table 1), however, the association was lost after the logistic regression.

From these results and considering the known role of ApoJ/CLU in cerebral β -amyloidosis (Howlett et al., 2013; Beeg et al., 2016), we next focused on the study of the potential genotypic association of the CLU SNPs (rs11136000, rs7012010, rs9331888 and rs9331896) with ApoJ levels in plasma, as well as its distribution among lipoproteins in samples from a subgroup of 60 patients with clinical suspicion of CAA. First, none of the demographic characteristics and main vascular risk factors evaluated were related with ApoJ levels in plasma or its content in VLDL, LDL or HDL lipoproteins (Supplemental Table 2). However, the variant rs1113600 was significantly associated with ApoJ content in HDL (T allele (MA) = 795.87 [586.48–1065.01] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ cholesterol (chol) vs. C allele = 614.68 [0–950.47] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ chol; $p=0.012$), whereas the association between rs9331896 and HDL-ApoJ content showed a statistical tendency (C allele (MA) = 795.87 [549.54–1065.01] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ chol vs. T allele = 644.44 [13.22–961.01] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ chol; $p=0.056$). In both cases, the minor allele (rs1113600 (T) and rs9331896 (C)) was

Table 2

cSS	50 (42.4%)
Focal	15 (30%)
Disseminated	35 (70%)
EPVS	109 (92.4%)
BG-EPVS	106 (97.25%)
Low degree (1-20)	85 (80.2%)
High degree (21->40)	21 (19.8%)
CSO-EPVS	88 (80.7%)
Low degree (1-20)	45 (51.1%)
High degree (21->40)	43 (48.9%)
CMB	73 (61.9%)
Lobar CMB	69 (94.52%)
1-5	25 (36.23%)
6-10	12 (17.39%)
11-20	7 (10.14%)
>20	25 (36.23%)
Deep CMB	14 (19.18%)
1 - 5	12 (85.7%)
6 - 10	1 (7.1%)
11 - 20	1 (7.1%)
>20	0 (0%)
Cerebellum CMB	15 (20.5%)
1 - 5	12 (80%)
6 - 10	3 (20%)
11 - 20	0 (0%)
>20	0 (0%)
WMH	108 (91.5%)
Periventricular	97 (89.8%)
Caps or pencil/thin lining (1)	24 (24.7%)
Smooth halo or irregular periventricular (2-3)	73 (75.3%)
Deep	98 (90.7%)
Punctate foci (1)	43 (43.9%)
Beginning or large confluent areas (2-3)	55 (56.1%)
Cortico-subcortical atrophy	44 (37.3%)
Mild	29 (65.9%)
Moderate	13 (29.5%)
Severe	2 (4.5%)

Table 2. MRI-imaging characteristics of a lobar ICH cohort with clinical suspicion of CAA (N = 118). The percentages displayed are within each category. cSS: cortical superficial siderosis; EPVS: Enlarged perivascular spaces; BG: Basal ganglia; CSO: Centrum semiovale; CMB: Cerebral microbleeds; WMH: White matter hyperintensity. Data are expressed as n (%).

associated with higher ApoJ content in HDL (Figure 2). No other associations were detected between CLU SNPs and circulating ApoJ levels (Supplemental Table 3).

On the other hand, whereas total plasma ApoJ levels resulted not linked to CAA-MRI markers, several associations were identified regarding ApoJ distribution among lipoproteins (Supplemental Table 1). Remarkably, lower ApoJ content in LDL was significantly associated with the presence of CSO-EPVS (absence = 104.06 [66.49–149.33] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ chol vs. presence = 60.78 [9.57–117.16] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ chol; $p=0.033$), and with the corresponding EPVS rating scale ($p=0.041$) (Figure 3.A). In addition, lower ApoJ content in HDL was significantly associated with corticosubcortical atrophy (absence= 756.79 [466.97–1028.20] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ chol vs. presence= 304.47 [0.00–795.87] $\mu\text{g}/\text{mmol}$ chol; $p=0.031$) and its severity ($p=0.020$) (Figure 3.B). After applying a linear regression adjusting by age and sex to underscore those variables independently associated with the protein circulating levels, we only found that certain MRI features remained significantly associated with ApoJ distribution in lipoproteins whereas the association with CLU SNPs lost significance. On the other hand, CSO-EPVS remained associated with circulating LDL ApoJ content and corticosubcortical atrophy remained associated with HDL ApoJ, independently of CLU SNPs (Figure 3.C).

We next explored the potential alteration of the circulating ApoE levels in the lobar ICH cohort. Although none of the demographic characteristics or clinical variables analyzed were associated with apoE concentration in plasma or with its distribution among lipoproteins (Supplemental Table 4), we found significantly higher levels of total plasma ApoE in patients carrying the $\epsilon 2$ allele (non APOE $\epsilon 2$ carriers= 43.16 \pm 14.02 mg/L vs. APOE $\epsilon 2$ carriers= 67.04 \pm 21.56 mg/L; $p<0.001$) and significantly lower total plasma ApoE levels associated with the presence of the $\epsilon 4$ allele (non APOE $\epsilon 4$ carriers= 48.59 \pm 17.17 mg/L vs. APOE $\epsilon 4$ carriers= 36.82 \pm 11.73 mg/L; $p=0.024$) (Supplemental Table 5), as previously described (Montañola et al., 2016; Marais, 2019). Furthermore, the APOE $\epsilon 2$ genotype was also significantly associated with higher levels of ApoE in LDL (non APOE $\epsilon 2$ carriers= 35.07 [17.64–51.61] $\mu\text{mol}/\text{mol}$ chol vs. APOE $\epsilon 2$ carriers = 67.48 [58.79–171.32] $\mu\text{mol}/\text{mol}$ chol; $p=0.001$) (Supplemental Table 5).

Interestingly, when analyzing the possible associations between circulating ApoE levels and the presence of the different MRI markers, we detected lower content of ApoE in LDL significantly associated with a higher extent of cortical superficial siderosis (focal

	Genetic and clinical variables	Common dominant model		Additive model	
		OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
cSS	CLU rs9331888 (G allele, MA)	2.490 (1.175 – 5.278)	0.017	1.889 (1.033 – 3.454)	0.039
	CD2AP rs10948363 (G allele, MA)	0.188 (0.042 – 0.836)	0.028	–	–
cSS extent	CD2AP rs9349407 (C allele, MA)	–	–	0.150 (0.039 – 0.581)	0.006
	CLU rs11136000 (T allele, MA)	6.722 (1.500 – 30.127)	0.013	8.264 (1.698 – 40.000)	0.009
CSO-EPVS	–	–	–	–	–
High degree CSO-EPVS	CLU rs7012010 (C allele, MA)	2.370 (1.073 – 5.237)	0.033	1.935 (1.082 – 3.462)	0.026
BG-EPVS	–	–	–	–	–
High degree BG-EPVS	CD33 rs3865444 (A allele, MA)	–	–	3.333 (1.437 – 7.752)	0.005
Lobar CMB	ABCA7 rs3764650 (G allele, MA)	0.313 (0.126 – 0.778)	0.012	0.290 (0.115 – 0.728)	0.008
	CLU rs7012010 (C allele, MA)	2.185 (1.006 – 4.749)	0.048	1.853 (1.016 – 3.378)	0.044
Lobar CMB >5	ABCA7 rs3764650 (G allele, MA)	0.323 (0.110 – 0.945)	0.039	–	–
	CLU rs11136000 (T allele, MA)	–	–	0.503 (0.278 – 0.911)	0.023
	TREML2 rs3747742 (C allele, MA)	2.306 (1.44 – 5.092)	0.039	1.918 (1.095 – 3.362)	0.023
High deep WMH burden	CR1 rs6701713 (A allele, MA)	0.420 (0.177 – 0.994)	0.048	0.419 (0.191 – 0.919)	0.030
	CLU rs9331888 (G allele, MA)	3.054 (1.404 – 6.642)	0.005	2.351 (1.234 – 4.478)	0.009
High periventricular WMH burden	CLU rs9331888 (G allele, MA)	2.673 (1.211 – 5.897)	0.015	–	–
	CLU rs9331896 (C allele, MA)	–	–	0.478 (0.270 – 0.848)	0.012
Atrophy	BIN1 rs6733839 (T allele, MA)	0.307 (0.132 – 0.715)	0.002	0.457 (0.237 – 0.881)	0.019
	CD2AP rs10948363 (G allele, MA)	0.257 (0.111 – 0.595)	0.006	0.359 (0.170 – 0.755)	0.007
	CLU rs7012010 (C allele, MA)	–	–	2.101 (1.125 – 3.924)	0.020
CAA-Small vessel disease burden score	ABCA7 rs3764650 (G allele, MA)	0.261 (0.096 – 0.711)	0.009	0.284 (0.105 – 0.764)	0.013
	CLU rs9331896 (C allele, MA)	–	–	0.470 (0.251 – 0.879)	0.018
	CLU rs9331888 (G allele, MA)	2.921 (1.246 – 6.851)	0.014	–	–
	EPHA1 rs11767557 (C allele, MA)	0.285 (0.109 – 0.744)	0.010	0.288 (0.118 – 0.698)	0.006
	TREML2 rs3747742 (C allele, MA)	2.787 (1.184 – 6.650)	0.019	1.963 (1.055 – 3.652)	0.033

Table 3. Binary logistic regression for CAA MRI markers with SNPs minor alleles adjusting by sex and age. cSS: cortical Superficial Siderosis; EPVS: Enlarged Perivascular Spaces; CSO: Centrum Semiovale; CMB: Cerebral Microbleeds; WMH: White Matter Hyperintensity. OR: Odds Ratio. CI: Confidence Interval. MA: Minor allele.

cSS = 76.19 [48.16–168.08] vs. disseminated cSS= 27.73 [9.85–60.51] $\mu\text{mol/mol}$ chol; $p=0.003$ (Figure 4.A). Also, as observed with the ApoJ protein study, we found that ApoE protein levels were associated with the presence of visible CSO-EPVS and their degree

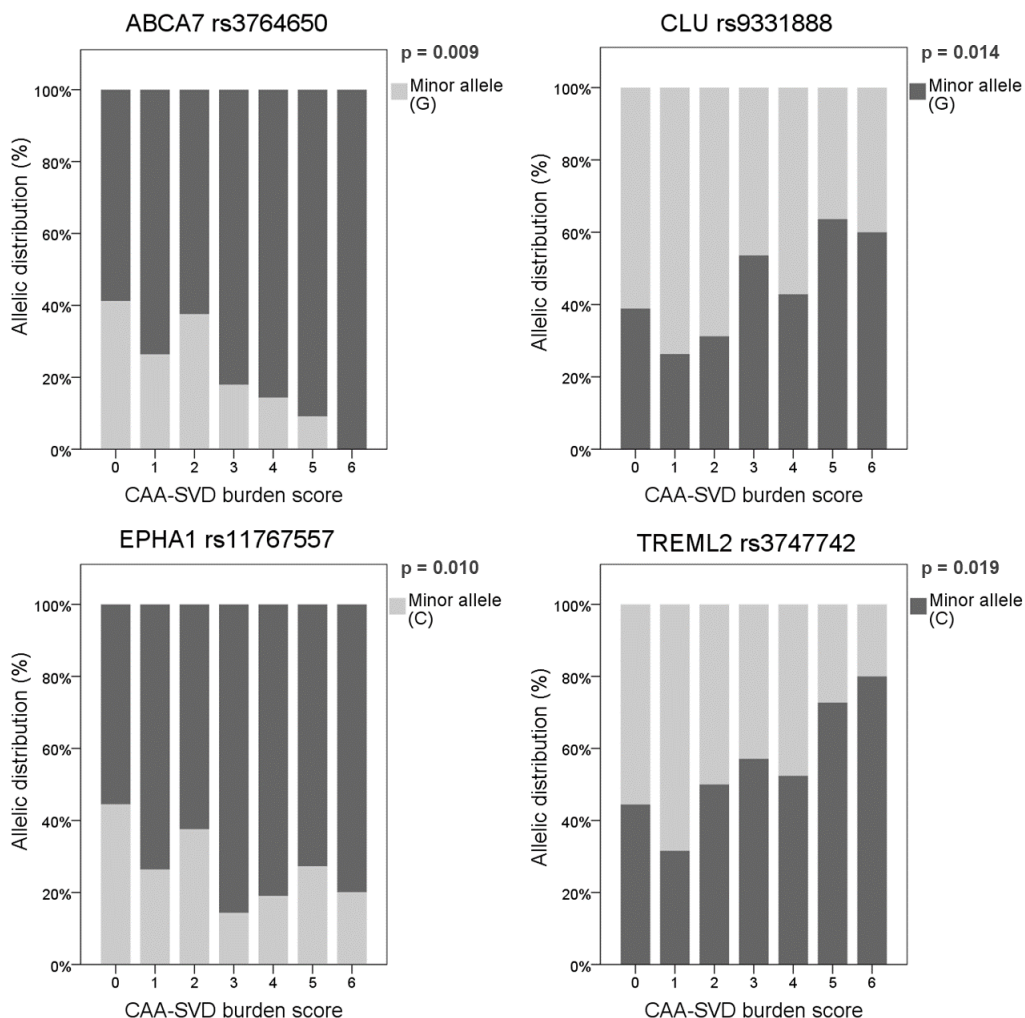


Figure 1. Allelic distribution of the SNPs associated with the CAA-SVD burden score using the common dominant model. The genetic risk factor (presenting or not the Minor allele) associated with a higher score is represented in dark grey, whereas the protective factor is represented in light grey. Allelic distribution is expressed as a percentage in each category of the score (0-6).

score. Lower total and HDL ApoE levels were significantly correlated with the presence of CSO-EPVS (absence= 55.61±21.15 mg/L and 441.36±267.94 µmol/mol chol vs. presence= 42.92±14.48 mg/L and 306.72±192.85 µmol/mol chol; p=0.014, and p=0.044, respectively) and with the corresponding degree score (p=0.045 and p=0.032, respectively) (Figure 4.B). After a linear regression adjustment considering age and sex to underscore those variables independently associated with ApoE circulating levels, we found that APOEε2 and ε4 genotypes resulted independently associated with total

plasma protein levels. In addition, APOEε2 genotype and cSS severity maintained the independent association with LDL ApoE levels. And finally, the presence of visible CSO-EPVS remained significantly associated with HDL ApoE levels. (Figure 4.C).

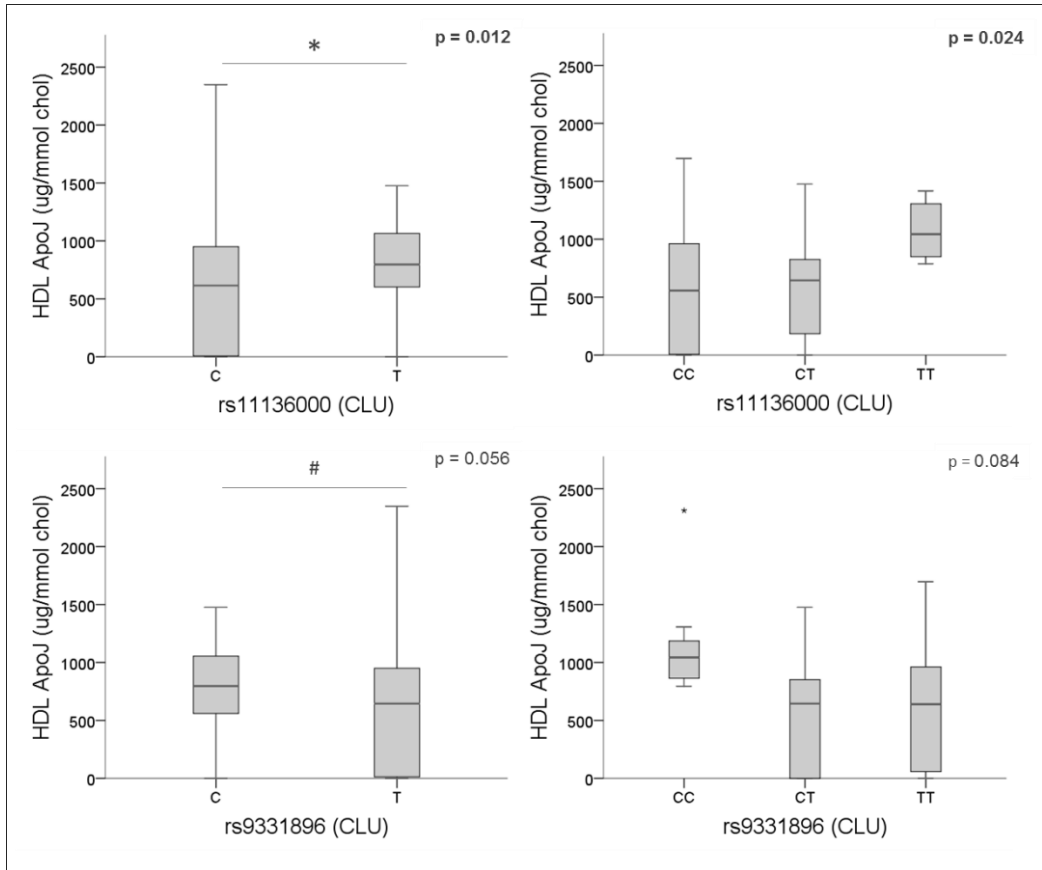


Figure 2. Association of CLU SNPs (rs1136000 (T), rs9331896 (C)) with ApoJ content in HDL. Boxplot representation of ApoJ content in HDL expressed as μg of ApoJ per mmol of cholesterol in HDL according to CLU SNPs alleles. * $p < 0.05$; # $p < 0.1$.

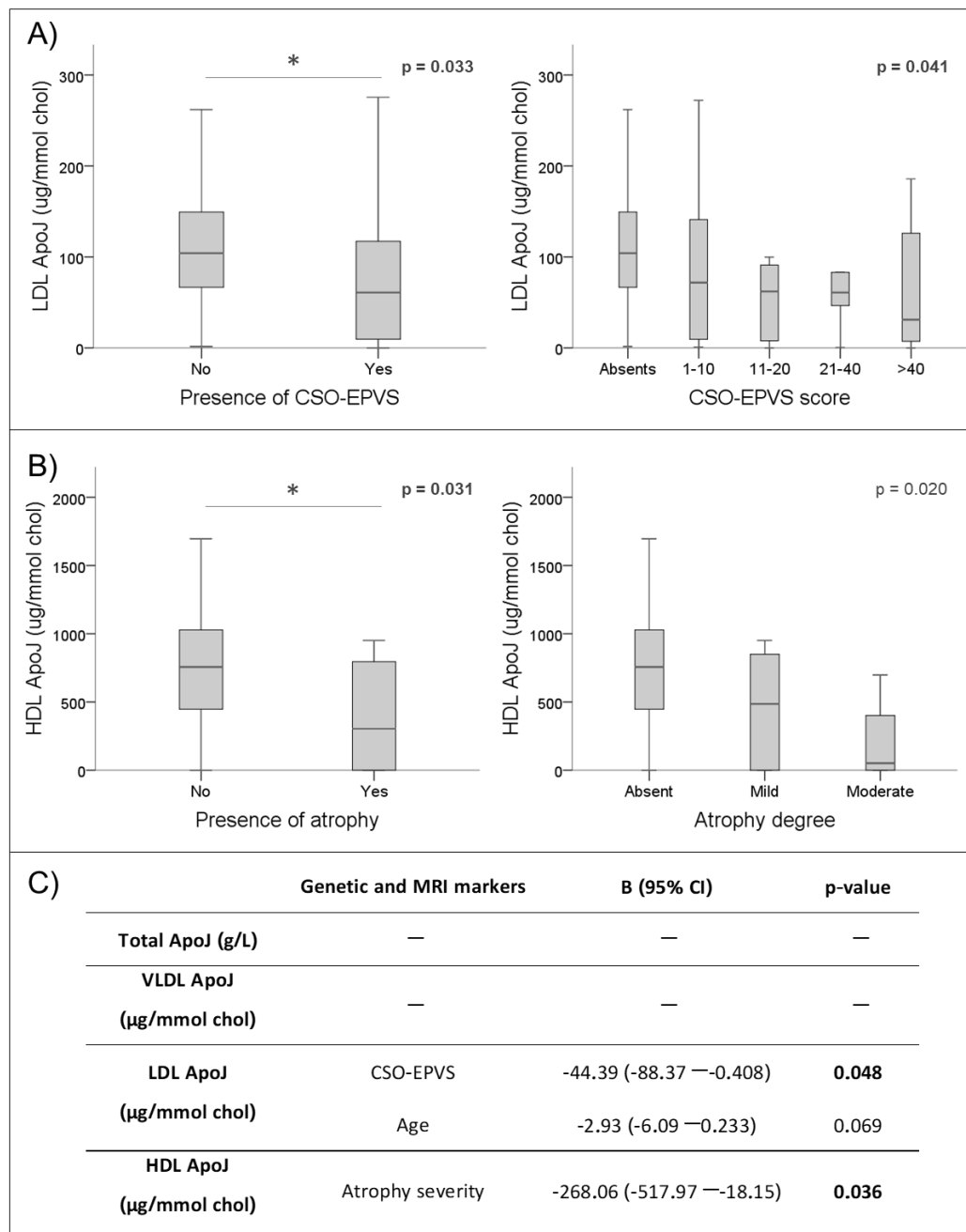


Figure 3. Association of ApoJ levels with MRI features associated with CAA. ApoJ levels are expressed as μg of ApoJ per mmol of cholesterol in each lipoprotein. A) Boxplot representation of ApoJ levels in LDL according to EPVS in Centrum Semiovale (CSO). B) ApoJ levels in HDL according to the presence and severity of cortico-subcortical atrophy. C) Linear regression for circulating ApoJ levels using the significant variables for each lipoprotein fraction (CLU SNPs and MRI markers) and adjusting by sex and age. * $p < 0.05$.

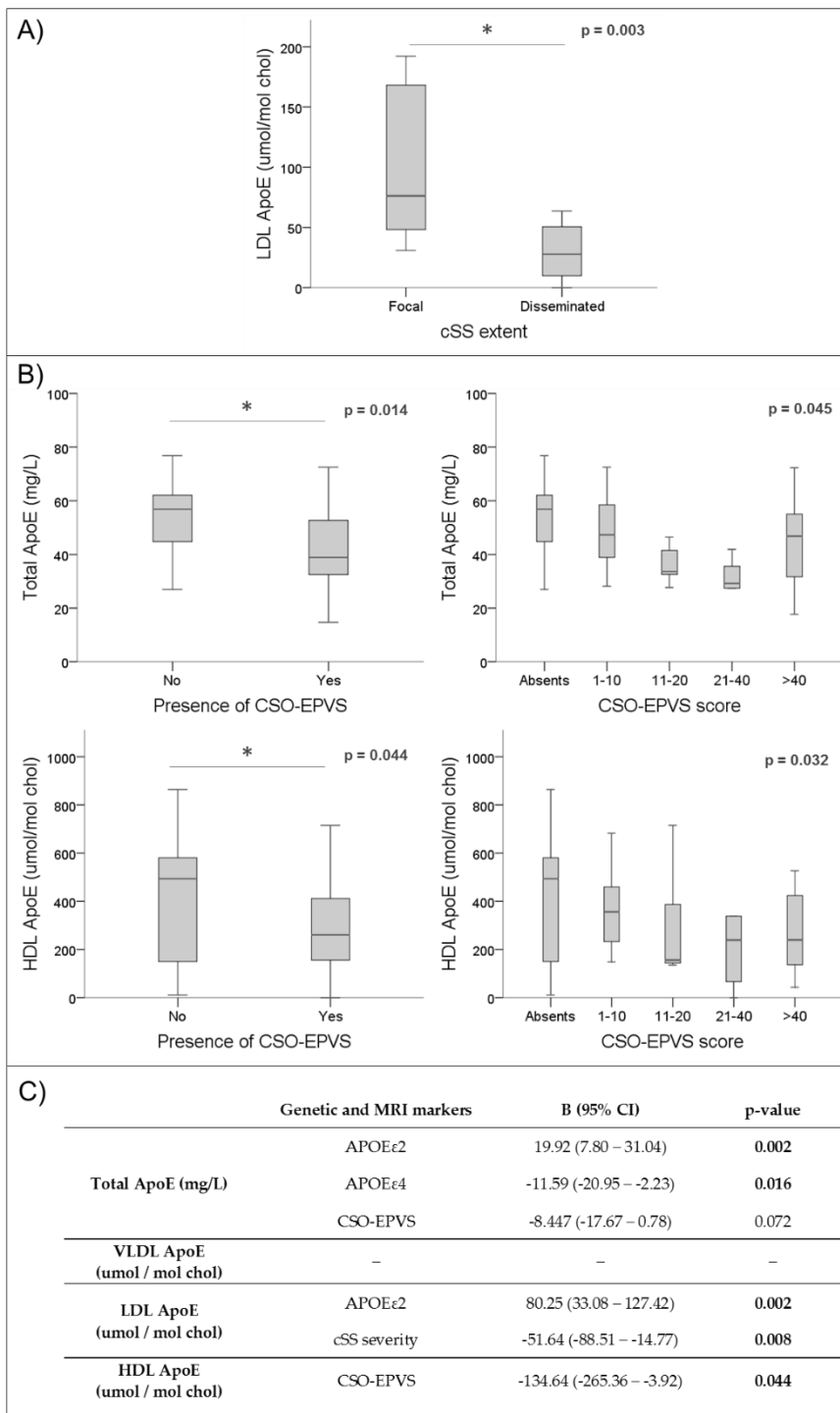


Figure 4. Association of ApoE levels with MRI features. ApoE levels are expressed as mg/L in plasma and μmol of ApoE per mol of cholesterol in each lipoprotein. A) Boxplot distribution of ApoE levels in LDL according to cortical superficial siderosis severity and distribution. B) Total and HDL ApoE levels according to EPVS in Centrum Semiovale (CSO). C) Linear regression for circulating ApoE levels using the significant variables for each lipoprotein fraction (APOE genotypes and MRI markers) and adjusting by sex and age. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Discussion

Detecting the cerebrovascular A β pathology is a crucial endpoint with diagnostic value and potential for monitoring CAA progression. In recent years, the development of positron emission tomography (PET) radiotracers for A β imaging (Farid et al., 2017; Chang et al., 2021) and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers (Kuiperij et al., 2020) have been an intensive focus of research in the CAA field, although high costs and the invasiveness of these tests make them still limited for the clinical practice. The evolution of the vascular pathology could be potentially monitored through the progression of SVD neuroimaging markers strongly associated with CAA pathology, although most of these features have little specificity (Chojdak-Lukasiewicz et al., 2021). Furthermore, although these MRI markers reflect distinct pathophysiologic aspects of the disease, biological mechanisms underlying their occurrence and topography are still under investigation. In this regard, the hypothesis of the present study was that candidate genes previously associated with different pathological aspects in AD could also be related, in accordance or in opposition, to the deposition of A β in blood vessels and may shed light on the biological impact of the MRI features commonly found in CAA patients. For this purpose, we tested the minor allele frequency of candidate AD-linked SNPs identified in previous GWAS (Lambert, 2013; Replogle et al., 2015) in a multicenter cohort of patients that suffered a lobar ICH with a clinical suspicion of CAA.

Initially, we found that the frequency of minor alleles in certain candidate genetic variants in the ICH-CAA cohort did not follow the same direction as the results previously described for AD pathology. This phenomenon is well established for the presence of the APOE ϵ 2 allele, which is a protective genetic variant for AD, whereas it is associated with a higher hemorrhagic load in CAA (Lambert, 2013; Greenberg et al., 2020). In this sense, for instance, ABCA7 rs3764650 (G) has been described as a risk factor for AD, without a direct influence on CAA (Beecham et al., 2014). However, other ABCA7 SNPs have been associated with both CAA and small vessel ischemic disease (Mäkelä et al., 2018; Blumenau et al., 2020). In our cohort, we observed that ABCA7 SNP rs3764650 (G) acted as a protective factor regarding the presence and number of lobar CMBs and also resulted to be less frequent in those cases with a higher CAA-SVD burden score. Also, TREML2 rs3747742 (C), a protective factor for AD (Benitez et al., 2014), acted as a risk factor for the presence of a high number of lobar CMB (>5) and resulted more frequent when increasing the CAA-SVD burden score. Finally, EPHA1 rs11767557 (C) was

significantly associated with lower punctuation in the neuroimaging CAA-SVD burden score. This SNP was previously related to a higher risk of AD; although other EPHA1 genetic polymorphisms have also been associated with small vessel ischemic disease (Wei et al., 2019; Blumenau et al., 2020). All these results add evidence to the complexity of pathophysiological processes that lead to the development of CAA or AD. ABCA7 has been previously associated with A β metabolism and neuritic plaque burden in AD (Shulman et al., 2013; Beecham et al., 2014; Mäkelä et al., 2018). Furthermore, ABCA7, in addition to TREML2 and EPHA1, has been proposed to influence A β clearance (Benitez et al., 2014; Karch and Goate, 2015; Mäkelä et al., 2018). Alterations in A β production and clearance may cause a redistribution of A β from parenchyma to vasculature, possibly causing a lower burden of neuritic plaques together with a major accumulation of A β in the cerebral vessels, which could explain how protective factors for AD could cause risk for CAA and vice versa. However, these genes are also involved in many biological mechanisms that may differently influence both pathologies, such as Tau pathology or BBB integrity maintenance (Shulman et al., 2013; Beecham et al., 2014; Benitez et al., 2014, Obermeier et al., 2013).

Interestingly, we observed that the 4 CLU SNPs studied were independently and significantly associated with several CAA neuroimaging markers. In more detail, rs7012010 (C) and rs9331888 (G) were previously widely described as risk markers for AD (Lambert et al., 2009; Yu and Tan, 2012; Tan et al., 2016; Foster et al., 2019). In the present study, we observed significant independent associations of rs7012010 (C) with the degree of CSO-EPVS and the presence of lobar CMB and brain atrophy; and rs9331888 (G) with the presence of cSS, WMH burden and a global higher CAA-SVD burden, as features presumably associated with a higher CAA severity in the lobar ICH population. On the contrary, rs11136000 (T) and rs9331896 (C) were previously described as protective factors for AD (Foster et al., 2019). In this sense, we observed rs9331896 (C) to be independently and significantly associated with a lower burden of periventricular WMH and CAA-SVD score and rs11136000 (T) with a reduced number of CMB, in line with a previous study of our group where rs11136000 (T) was associated with the absence of lobar CMBs (Montañola et al., 2016). Altogether, in the lobar-ICH cohort, the allelic frequencies of CLU SNPs rs9331896 (C) and rs9331888 (G) followed the pattern of potential risk/protective factors previously described in AD. A recent study found several different CLU haplotypes associated with lobar ICH, suggesting that

different CLU SNPs are clearly involved in ICH and that different SNPs within the same gene could cause the same phenotypic endpoint (Sawyer et al., 2022). Regarding APOE genotype, the presence of $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles had no impact on the common CAA MRI features, although APOE $\epsilon 2$ carriers presented a statistical tendency to higher CAA-SVD burden score. Previous studies found an association of APOE $\epsilon 4$ with strictly lobar CMB (Shams et al., 2022) and APOE $\epsilon 2$ with cSS (Charidimou et al., 2015) although these results have not been confirmed in other studies (Shoamanesh et al., 2014; Montañaola et al., 2016; Shams et al., 2022).

Because we found a relevant association of different CLU SNPs with the presence of several MRI features associated with CAA, we further explored their potential linked with ApoJ peripheral levels. In fact, it has been extensively described that certain CLU SNPs may affect ApoJ expression and levels (Szymanski et al., 2011; Xing et al., 2012; Cai et al., 2016; Tan et al., 2016). None of the SNPs analyzed was associated with changes in ApoJ plasma concentration, but some associations with the distribution of ApoJ in lipoproteins were observed. In this sense, we detected that the rs11136000 (T) and rs9331896 (C) SNPs were specifically related with higher content of ApoJ in HDLs. Indeed, rs11136000 (T) has been described to increase cerebral ApoJ expression in AD patients and controls (Allen et al., 2012; Ling et al., 2012), although studies regarding its impact on plasma levels have found different results (Schürmann et al., 2011; Mullan et al., 2013). Therefore, we observed that only the AD-protective CLU SNPs (rs11136000 (T) and rs9331896 (C)) were associated with higher ApoJ content in HDL, the circulating lipoprotein with higher content of ApoJ, in an allelic-dependent manner.

On the other hand, we used the same strategy regarding associations between genetic APOE variants and ApoE plasma concentration and its distribution among lipoproteins. Unlike what is observed for ApoJ, total plasma levels of ApoE are modulated by the APOE alleles. In this sense, we detected that carrying the $\epsilon 2$ allele significantly increased total plasma ApoE levels, whereas $\epsilon 4$ significantly decreased its levels as has been extensively described in different cohorts (Montañaola et al., 2016; Rasmussen, 2016). Regarding ApoE distribution among plasma lipoproteins, we observed that APOE $\epsilon 2$ carriers presented also significantly increased ApoE content in LDL. It is important to consider that apart from altering ApoE levels, APOE genotype also influences ApoE structure and functionality, and thus, affects processes such as the clearance of parenchymal A β through LRP1 (Yin and Wang, 2018).

In order to understand the biological impact of the MRI markers analyzed, we studied potential associations with ApoJ and ApoE circulating levels in the CAA-ICH cohort. ApoE and ApoJ content in both HDL and LDL are negatively associated with several MRI features. Specifically, we found that lower ApoJ content in LDL and lower ApoE levels in plasma and HDL were associated with CSO-EPVS presence and degree. EPVS in CSO have been related to high A β burden in CAA and AD patients in post-mortem histopathological studies (Roher et al., 2003; van Veluw et al., 2016; Perosa et al., 2022), suggesting that these pathological space enlargements may be the consequence of the impairment in the perivascular drainage pathways (Hawkes et al., 2011; Arbel-Ornath et al., 2013; Perosa et al., 2022). Interestingly, in a previous study, we found ApoJ LDL content to be significantly elevated in AD patients compared to controls, but not in the ICH-CAA cohort (Bonaterra-Pastra et al., 2021), suggesting that the content of ApoJ in LDL could influence the A β traffic within the brain. Moreover, it has been previously described that ApoJ treatment could improve HDL functionality regarding atheroprotective, anti-oxidative and anti-inflammatory properties (Rivas-Urbina et al., 2020). Also, ApoE in HDL could act as a protective factor since AD patients present HDL with lower ApoE content (Pedrini et al., 2022), and in our previous study, we observed that subjects from an ICH-CAA cohort presented a higher ratio of ApoE/ApoC-III in HDL than controls which we hypothesized to be a defensive response against vascular A β deposition (Bonaterra-Pastra et al., 2021). Higher circulating ApoE levels are known to be atheroprotective, and ApoE-enriched HDL are able to reduce CAA in an in vitro model (Morton et al., 2019; Robert et al., 2020). Altogether we propose that higher content of ApoJ and ApoE in LDL and HDL may enhance the drainage of A β from brain vessels, displaying protective properties. Both ApoE and ApoJ bind A β and are established ligands for different receptors of the LDL receptor family such as LDL receptor, ApoE receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein 1 (LRP1) and megalin. Therefore, lower content of ApoJ and ApoE in lipoproteins may be related with higher vascular A β deposition, which could be translated to a more prominent occurrence and severity of different CAA-SVD markers.

In summary, we observed several genetic variants previously associated with AD (SNPs on ABCA7, BIN1, CD2AP, CLU, CR1, EPHA1 and TREML2) to be associated with MRI markers of CAA. In more detail, the CLU SNPs studied were independently and significantly associated with several CAA markers and followed the same risk/protective

direction as previously described for AD. We observed CLU SNPs and APOE genotype described as protective factors for AD to be associated with higher ApoJ and ApoE content in lipoproteins. Furthermore, ApoJ and ApoE distribution among lipoproteins was associated with CAA-MRI features, such as the presence of CSO-EPVS and their degree score. We suggest that higher ApoE and ApoJ levels in HDL and LDL might enhance atheroprotective and anti-inflammatory responses in cerebral amyloidosis. This study reinforces the relevance of peripheral lipid metabolism and cerebrovascular functionality in CAA and could open the path for new therapeutic strategies. However, the meaning of our findings regarding ApoJ and ApoE distribution in lipoproteins and their link to A β pathology needs further research and confirmation in larger cohorts. An important limitation of our study is that all the patients from our cohort presented a symptomatic ICH and some of the results observed could be due to pathological changes associated with this hemorrhagic phenotype. We tried to overcome this issue by collecting the blood samples of the participants for protein determinations in a non-acute phase of the disease to avoid the massive inflammatory cascade produced after the stroke. Also, as an observational study, we cannot confirm the causality of the differences observed in ApoJ and ApoE circulating levels. Finally, although we are in front of a multicenter study, the sample size is still small and larger studies with a higher number of patients should be conducted, especially regarding the genetic association's analysis.

Author Contributions: Conceptualization: M.H-G.; Methodology: A.B-P and S.B.; Recruitment of patients: O.P., D.R-L., F.P, M.M.F., S.T., M.M-Z., P.C.P., R.V., L.L-H., J.F.A., S.P-S., A.D-M, J.M-F, G.M and J.M.; Formal analysis: A.B-P., M.H-G.; Writing—original draft preparation: A.B-P.; Writing—review and editing: M.H-G. and J.L.S-Q.; Supervision: M.H-G. and J.L.S-Q.; Funding acquisition: M.H-G. and J.L.S-Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), (PI17/00275, PI019/00421, PI20/00465, PI20/00334) and co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). The Neurovascular Research Laboratory is part of the RICORS-ICTUS-Enfermedades Vasculares Cerebrales network, ISCIII, Spain (RD21/0006/0007). CIBERDEM (CB07/08/0016) is an ISCIII Project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Bibliography

- Allen, M., Zou, F., Chai, H. S., Younkin, C. S., Crook, J., Shane Pankratz, V., et al. (2012). Novel late-onset Alzheimer disease loci variants associate with brain gene expression. *Neurology* 79, 221–228. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182605801.
- Arbel-Ornath, M., Hudry, E., Eikermann-Haerter, K., Hou, S., Gregory, J. L., Zhao, L., et al. (2013). Interstitial fluid drainage is impaired in ischemic stroke and Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathol* 126, 353–364. doi: 10.1007/s00401-013-1145-2.
- Arvanitakis, Z., Leurgans, S. E., Wang, Z., Wilson, R. S., Bennett, D. A., and Schneider, J. A. (2011). Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Cognitive Domains in Older Persons. *Ann Neurol* 69, 320–327. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Beecham, G. W., Hamilton, K., Naj, A. C., Martin, E. R., Huentelman, M., Myers, A. J., et al. (2014). Genome-Wide Association Meta-analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias. *PLoS Genet* 10. doi: 10.1371/journal.pgen.1004606.
- Beeg, M., Stravalaci, M., Romeo, M., Carrá, A. D., Cagnotto, A., Rossi, A., et al. (2016). Clusterin binds to A β 1-42 Oligomers with high affinity and interferes with peptide aggregation by inhibiting primary and secondary nucleation. *Journal of Biological Chemistry* 291, 6958–6966. doi: 10.1074/jbc.M115.689539.
- Benitez, B. A., Jin, S. C., Guerreiro, R., Graham, R., Lord, J., Harold, D., et al. (2014). Missense variant in TREML2 protects against Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.010.
- Blumenau, S., Foddiss, M., Müller, S., Holtgrewe, M., Bentele, K., Berchtold, D., et al. (2020). Investigating APOE, APP-A β metabolism genes and Alzheimer's disease GWAS hits in brain small vessel ischemic disease. *Sci Rep* 10. doi: 10.1038/s41598-020-63183-5.
- Bonaterra-Pastra, A., Fernández-De-retana, S., Rivas-Urbina, A., Puig, N., Benítez, S., Pancorbo, O., et al. (2021). Comparison of plasma lipoprotein composition and function in cerebral amyloid angiopathy and alzheimer's disease. *Biomedicines* 9, 72. doi: 10.3390/biomedicines9010072.
- Boulouis, G., Charidimou, A., Pasi, M., Roongpiboonsopit, D., Xiong, L., Auriel, E., et al. (2017). Hemorrhage Recurrence Risk Factors In Cerebral Amyloid Angiopathy: Comparative Analysis of the Overall Small Vessel Disease Severity score versus Individual Neuroimaging markers. *J Neurol Sci.* 380, 64–67. doi: 10.1016/j.jns.2017.07.015.
- Bu, G. (2010). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Ratio (Oxf)* 36, 490–499. doi: 10.1124/dmd.107.016501.CYP3A4-Mediated.

- Cai, R., Han, J., Sun, J., Huang, R., Tian, S., Shen, Y., et al. (2016). Plasma clusterin and the CLU gene rs11136000 variant are associated with mild cognitive impairment in type 2 diabetic patients. *Front Aging Neurosci* 8, 179. doi: 10.3389/fnagi.2016.00179.
- Chang, Y., Liu, J., Wang, L., Li, X., Wang, Z., Lin, M., et al. (2021). Diagnostic Utility of Integrated¹¹C-Pittsburgh Compound B Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance for Cerebral Amyloid Angiopathy: A Pilot Study. *Front Aging Neurosci* 13. doi: 10.3389/fnagi.2021.721780.
- Charidimou, A., Boulouis, G., Frosch, M. P., Baron, J.-C., Pasi, M., Albuher, J. F., et al. (2022). The Boston criteria version 2.0 for cerebral amyloid angiopathy: a multicentre, retrospective, MRI-neuropathology diagnostic accuracy study. *Lancet Neurol* 21, 714–725. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00208-3.
- Charidimou, A., Boulouis, G., Gurol, M. E., Ayata, C., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., et al. (2017a). Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain* 140, 1829–1850. doi: 10.1093/brain/awx047.
- Charidimou, A., Boulouis, G., Pasi, M., Auriel, E., van Etten, E. S., Haley, K., et al. (2017b). MRI-visible perivascular spaces in cerebral amyloid angiopathy and hypertensive arteriopathy. *Neurology* 88, 1157–1164. doi: 10.1212/WNL.0000000000003746.
- Charidimou, A., Boulouis, G., Roongpiboonsopit, D., Auriel, E., Pasi, M., Haley, K., et al. (2017c). Cortical superficial siderosis multifocality in cerebral amyloid angiopathy A prospective study. doi: 10.1212/WNL.0000000000004665.
- Charidimou, A., Imaizumi, T., Moulin, S., Biffi, A., Samarasekera, N., Yakushiji, Y., et al. (2017d). Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology* 89, 820–829. doi: 10.1212/WNL.0000000000004259.
- Charidimou, A., Martinez-Ramirez, S., Reijmer, Y. D., Oliveira-Filho, J., Lauer, A., Roongpiboonsopit, D., et al. (2016). Total magnetic resonance imaging burden of small vessel disease in cerebral amyloid angiopathy an imaging-pathologic study of concept validation. *JAMA Neurol* 73, 994–1001. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.0832.
- Charidimou, A., Martinez-Ramirez, S., Shoamanesh, A., Oliveira-Filho, J., Frosch, M., Vashkevich, A., et al. (2015). Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: Evidence for different disease phenotypes. *Neurology* 84, 1206. doi: 10.1212/WNL.0000000000001398.
- Chojdak-Łukasiewicz, J., Dziadkowiak, E., Zimny, A., and Paradowski, B. (2021). Cerebral small vessel disease: A review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 30, 349–356. doi: 10.17219/ACEM/131216.
- Cordonnier, C., Potter, G. M., Jackson, C. A., Doubal, F., Keir, S., Sudlow, C. L. M., et al. (2009). Improving interrater agreement about brain microbleeds: Development

- of the Brain Observer MicroBleed Scale (BOMBS). *Stroke* 40, 94–99. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.526996.
- Farid, K., Charidimou, A., and Baron, J. C. (2017). Amyloid positron emission tomography in sporadic cerebral amyloid angiopathy: A systematic critical update. *Neuroimage Clin* 15, 247–263. doi: 10.1016/j.nicl.2017.05.002.
- Fazekas, F., Chawluk, J. B., Alavi, A., Hurtig, H. I., and Zimmerman, R. A. (1987). MR Signal Abnormalities At 1.5-T in Alzheimer Dementia and Normal Aging. *American Journal of Roentgenology* 149, 351–356. doi: 10.2214/ajr.149.2.351.
- Foster, E. M., Dangla-Valls, A., Lovestone, S., Ribe, E. M., and Buckley, N. J. (2019). Clusterin in Alzheimer's disease: Mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. *Front Neurosci* 13, 1–27. doi: 10.3389/fnins.2019.00164.
- Giralt-Steinhauer, E., Jiménez-Balado, J., Fernández-Pérez, I., Rey Álvarez, L., Rodríguez-Campello, A., Ois, Á., et al. (2022). Genetics and Epigenetics of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Int J Mol Sci* 23, 6479. doi: 10.3390/ijms23126479.
- Giri, M., Zhang, M., and Lü, Y. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: An overview and current status. *Clin Interv Aging* 11, 665–681. doi: 10.2147/CIA.S105769.
- Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., and van Veluw, S. J. (2020). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* 16, 30–42. doi: 10.1038/s41582-019-0281-2.
- Greenberg, S. M., Briggs, M. E., Hyman, B. T., Kokoris, G. J., Takis, C., Kanter, D. S., et al. (1996). Apolipoprotein E ϵ 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 27, 1333–1337. doi: 10.1161/01.STR.27.8.1333.
- Greenberg, S. M., Vonsattel, J.-P. G., Segal, A. Z., Chiu, R. I., Clatworthy, A. E., Liao, A., et al. (1998). Association of apolipoprotein E and ϵ 2 vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 50, 638–643. doi: 10.1212/wnl.50.4.961.
- Hawkes, C. A., Härtig, W., Kacza, J., Schliebs, R., Weller, R. O., Nicoll, J. A., et al. (2011). Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 121, 431–443. doi: 10.1007/s00401-011-0801-7.
- Howlett, D. R., Hortobágyi, T., and Francis, P. T. (2013). Clusterin associates specifically with A β 40 in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain Pathol* 23, 623–32. doi: 10.1111/bpa.12057.
- Huynh, T. P. v., Davis, A. A., Ulrich, J. D., and Holtzman, D. M. (2017). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: The influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. *J Lipid Res* 58, 824–836. doi: 10.1194/jlr.R075481.

- Inoue, Y., Ando, Y., Misumi, Y., and Ueda, M. (2021). Current management and therapeutic strategies for cerebral amyloid angiopathy. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/ijms22083869.
- Karch, C. M., and Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry* 77, 43–51. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.05.006.Alzheimer.
- Koch, M., and Jensen, M. K. (2016). HDL-cholesterol and apolipoproteins in relation to dementia. *Curr Opin Lipidol* 27, 76–87. doi: 10.1097/MOL.0000000000000257.
- Kuiperij, H. B., Hondius, D. C., Kersten, I., Versleijen, A. A. M., Rozemuller, A. J. M., Greenberg, S. M., et al. (2020). Apolipoprotein D: a potential biomarker for cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 46, 431–440. doi: 10.1111/nan.12595.
- Lambert, J.-C. (2013). Meta-Analysis of 74,046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease. *Nat Genet* 45, 1452–1458. doi: 10.1038/ng.2802.Meta-analysis.
- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1094–9. doi: 10.1038/ng.439.
- Lanfranco, M. F., Ng, C. A., and Rebeck, G. W. (2020). ApoE lipidation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* 21, 1–19. doi: 10.3390/ijms21176336.
- Ling, I. F., Bhongsatiern, J., Simpson, J. F., Fardo, D. W., and Estus, S. (2012). Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS One* 7. doi: 10.1371/journal.pone.0033923.
- Linn, J., Halpin, A., Demaerel, P., Ruhland, J., Giese, A., Dichgans, M., et al. (2010). Prevalence of Superficial Siderosis in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neurology* 74, 1346–1350. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f002c1.
- Mäkelä, M., Kaivola, K., Valori, M., Paetau, A., Polvikoski, T., Singleton, A. B., et al. (2018). Alzheimer risk loci and associated neuropathology in a population-based study (Vantaa 85+). *Neurol Genet* 4. doi: 10.1212/NXG.0000000000000211.
- Marais, A. D. (2019). Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* 51, 165–176. doi: 10.1016/j.pathol.2018.11.002.
- Marazuela, P., Bonaterra-Pastra, A., Faura, J., Penalba, A., Pizarro, J., Pancorbo, O., et al. (2021). Circulating AQP4 Levels in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy-Associated Intracerebral Hemorrhage. *J Clin Med* 10, 989. doi: 10.3390/jcm10050989.
- Montañola, A., de Retana, S. F., López-Rueda, A., Merino-Zamorano, C., Penalba, A., Fernández-Álvarez, P., et al. (2016). ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and

- Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med* 18, 99–108. doi: 10.1007/s12017-015-8381-7.
- Morton, A. M., Furtado, J. D., Mendivil, C. O., and Sacks, F. M. (2019). Dietary unsaturated fat increases HDL metabolic pathways involving apoE favorable to reverse cholesterol transport. *JCI Insight* 4, 1–14. doi: 10.1172/jci.insight.124620.
- Mullan, G. M., McEneny, J., Fuchs, M., McMaster, C., Todd, S., McGuinness, B., et al. (2013). Plasma clusterin levels and the rs11136000 genotype in individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 10, 973–978. doi: 10.2174/15672050113106660162.
- Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain-barrier. *Nat Med* 19, 1584–1596. doi: 10.1038/nm.3407.Development.
- Pedrini, S., Doecke, J. D., Hone, E., Wang, P., Thota, R., Bush, A. I., et al. (2022). Plasma high-density lipoprotein cargo is altered in Alzheimer's disease and is associated with regional brain volume. *J Neurochem*, 1–15. doi: 10.1111/jnc.15681.
- Perosa, V., Oltmer, J., Munting, L. P., Freeze, W. M., Auger, C. A., Scherlek, A. A., et al. (2022). Perivascular space dilation is associated with vascular amyloid- β accumulation in the overlying cortex. *Acta Neuropathol* 143, 331–348. doi: 10.1007/s00401-021-02393-1.
- Rasmussen, K. L. (2016). Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype and risk of dementia and ischemic heart disease: A review. *Atherosclerosis* 255, 145–155. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.037.
- Repogle, J., Chan, G., White, C., Raj, T., Winn, P., Evans, D., et al. (2015). A TREM1 variant alters the accumulation of Alzheimer-related amyloid pathology. 67, 558–569. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06085.x.Compensation.
- Robert, J., Button, E. B., Martin, E. M., McAlary, L., Gidden, Z., Gilmour, M., et al. (2020). Cerebrovascular amyloid Angiopathy in bioengineered vessels is reduced by high-density lipoprotein particles enriched in Apolipoprotein e. *Mol Neurodegener* 15, 1–21. doi: 10.1186/s13024-020-00366-8.
- Roher, A. E., Kuo, Y. M., Esh, C., Knebel, C., Weiss, N., Kalback, W., et al. (2003). Cortical and leptomeningeal cerebrovascular amyloid and white matter pathology in Alzheimer's disease. *Molecular Medicine* 9, 112–122. doi: 10.1007/bf03402043.
- Sawyer, R. P., Demel, S. L., Comeau, M. E., Marion, M., Rosand, J., Langefeld, C. D., et al. (2022). Alzheimer's disease related single nucleotide polymorphisms and correlation with intracerebral hemorrhage incidence. *Medicine* 101, e30782. doi: 10.1097/md.00000000000030782.
- Scheltens, P., de Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., et al. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet* 397, 1577–1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.

- Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., et al. (1993). Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9649–9653. doi: 10.1073/pnas.90.20.9649.
- Schürmann, B., Wiese, B., Bickel, H., Weyerer, S., Riedel-Heller, S. G., Pentzek, M., et al. (2011). Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration. *Journal of Alzheimer's Disease* 25, 421–424. doi: 10.3233/JAD-2011-110251.
- Serrano-Pozo, A., Das, S., and Hyman, B. T. (2021). APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol* 20, 68–80. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
- Shams, M., Shams, S., Martola, J., Cavallin, L., Granberg, T., Kaijser, M., et al. (2022). MRI Markers of Small Vessel Disease and the APOE Allele in Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci* 14, 897674. doi: 10.3389/fnagi.2022.897674.
- Shoamanesh, A., Martinez-Ramirez, S., Oliveira-Filho, J., Reijmer, Y., Falcone, G. J., Ayres, A., et al. (2014). Interrelationship of superficial siderosis and microbleeds in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 83, 1838–1843. doi: 10.1212/WNL.0000000000000984.
- Shulman, J. M., Chen, K., Keenan, B. T., Chibnik, L. B., Fleisher, A., Thiyyagura, P., et al. (2013). Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. *JAMA Neurol* 70, 1150–1157. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.2815.
- Smith, E. E., Charidimou, A., Ayata, C., Werring, D. J., and Greenberg, S. M. (2021). Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Transient Focal Neurologic Episodes. *Neurology* 97, 231–238. doi: 10.1212/WNL.0000000000012234.
- Szymanski, M., Wang, R., Bassett, S. S., and Avramopoulos, D. (2011). Alzheimer's risk variants in the clusterin gene are associated with alternative splicing. *Transl Psychiatry* 1. doi: 10.1038/tp.2011.17.
- Tan, L., Wang, H., Tan, M., Tan, C., Zhu, X., Miao, D., et al. (2016). Effect of CLU genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging markers in healthy , mild cognitive impairment and Alzheimer ' s disease cohorts. *Nature Publishing Group*, 1–12. doi: 10.1038/srep26027.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. (2002). *Circulation* 106, 3143–3421.
- van Veluw, S. J., Biessels, G. J., Bouvy, W. H., Spliet, W. G., Zwanenburg, J. J., Luijten, P. R., et al. (2016). Cerebral amyloid angiopathy severity is linked to dilation of juxtacortical perivascular spaces. *JCBFM* 36, 576–580. doi: 10.1177/0271678X15620434.
- Wardlaw, J. M., Smith, E. E., Biessels, G. J., Cordonnier, C., Fazekas, F., Frayne, R., et al. (2013). Neuroimaging standards for research into small vessel disease and

its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12, 822–838. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70124-8.

Wei, C. J., Cui, P., Li, H., Lang, W. J., Liu, G. Y., and Ma, X. F. (2019). Shared genes between Alzheimer's disease and ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther* 25, 855–864. doi: 10.1111/cns.13117.

Xing, Y. Y., Yu, J. T., Cui, W. Z., Zhong, X. L., Wu, Z. C., Zhang, Q., et al. (2012). Blood clusterin levels, rs9331888 polymorphism, and the risk of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 29, 515–519. doi: 10.3233/JAD-2011-111844.

Yamada, M. (2015). Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke* 17, 17–30. doi: 10.5853/jos.2015.17.1.17.

Yin, Y., and Wang, Z. (2018). ApoE and neurodegenerative diseases in aging. *Adv Exp Med Biol* 1086, 77–92. doi: 10.1007/978-981-13-1117-8_5.

Yu, J. T., and Tan, L. (2012). The role of clusterin in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis, and therapy. *Mol Neurobiol* 45, 314–326. doi: 10.1007/s12035-012-8237-1.

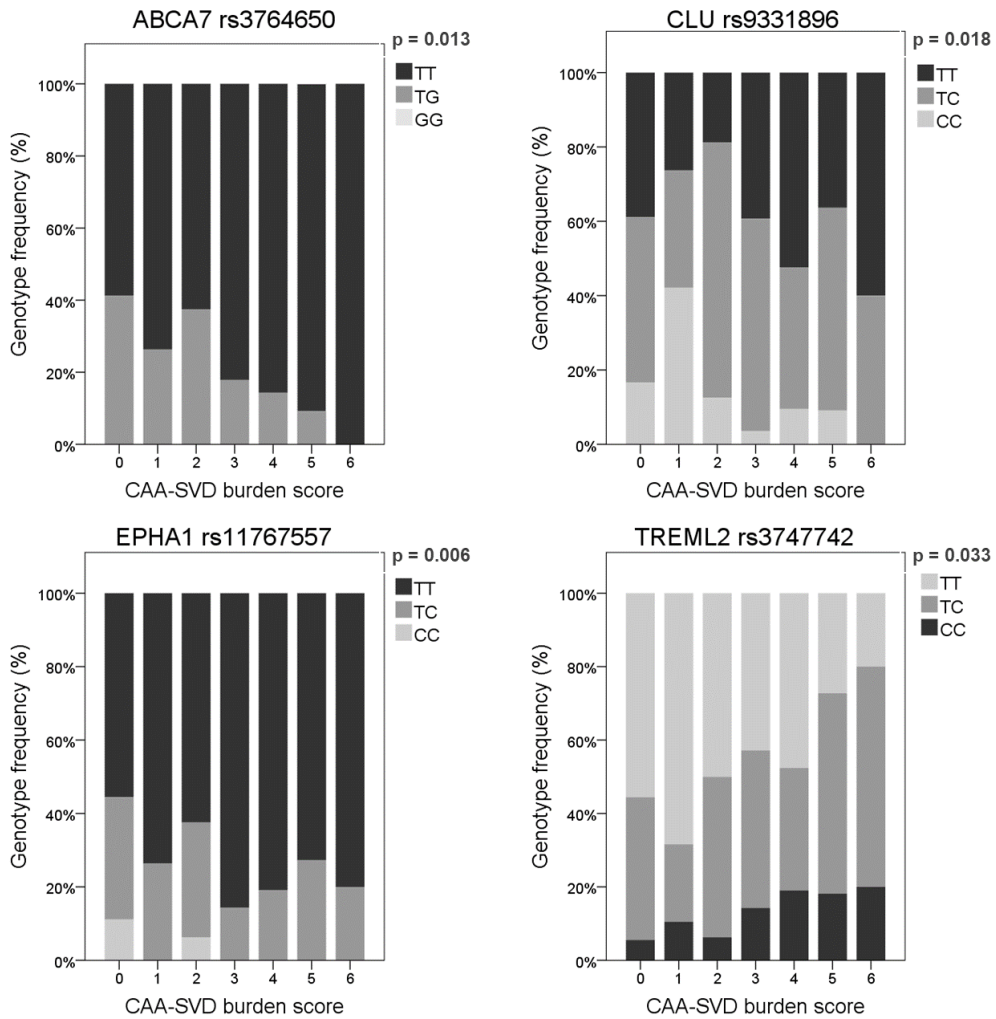
Supplemental Table 1

	cSS	cSS extent	CSO-EPVS	CSO-EPVS degree	BG-EPVS	BG-EPVS degree	Lobar CMB	Lobar CMB >5	WMH deep burden	WMH PV burden	Atrophy	CAA-SVD burden score (low vs. high)
Sex	0.635	0.758	0.111	0.876	0.16	0.144	0.584	0.473	0.252	0.078	0.473	0.753
Age	0.946	0.256	0.538	0.282	0.669	0.086	0.759	0.458	0.173	0.126	0.144	0.483
HT	0.972	0.228	0.311	0.678	1	0.691	0.723	0.565	0.739	0.276	0.989	0.629
DM	0.233	0.647	0.561	0.438	0.686	0.304	0.229	0.076	0.962	0.682	0.401	0.183
DL	1.000	0.822	0.895	0.827	0.764	0.322	0.218	0.300	0.441	0.524	0.703	0.591
ABCA7 rs3764650 (G allele, MA)	0.143	1.000	0.614	0.215	0.495	0.593	0.009	0.029	0.488	0.229	0.079	0.013
ABCA7 rs4147929 (A allele, MA)	0.630	0.133	0.663	0.502	0.653	0.789	0.013	0.079	0.992	0.227	0.017	0.132
ACE rs4311 (C allele, MA)	0.684	0.570	0.648	0.446	0.487	0.481	0.988	0.31	0.958	0.467	0.949	0.855
BIN1 rs6733839 (T allele, MA)	0.837	0.927	0.128	0.973	0.878	0.832	0.639	0.656	0.088	0.721	0.032	0.748
BIN1 rs744373 (G allele, MA)	0.328	0.641	0.201	0.425	0.523	0.447	0.462	0.565	0.146	0.421	0.117	0.964
CD2AP rs10948363 (G allele, MA)	0.180	0.008	0.622	0.416	0.503	0.585	0.710	0.329	0.430	0.813	0.013	0.597
CD2AP rs9349407 (C allele, MA)	0.180	0.008	0.622	0.416	0.503	0.585	0.710	0.329	0.430	0.813	0.013	0.597
CD33 rs3865444 (A allele, MA)	0.729	0.302	0.611	0.036	0.92	0.005	0.090	0.317	0.468	0.489	0.591	0.676
CLU rs11136000 (T allele, MA)	0.046	0.031	0.305	0.176	0.84	0.113	0.139	0.017	0.090	0.009	0.198	0.006
CLU rs7012010 (C allele, MA)	0.559	0.146	0.672	0.025	0.694	0.176	0.034	0.142	0.937	0.321	0.009	0.101
CLU rs9331888 (G allele, MA)	0.033	0.852	0.300	0.274	0.136	0.844	0.714	0.120	0.010	0.020	0.534	0.023
CLU rs9331896 (C allele, MA)	0.041	0.042	0.235	0.248	0.91	0.264	0.149	0.028	0.147	0.010	0.417	0.006
CR1 rs6656401 (A allele, MA)	0.331	0.601	0.260	0.315	0.216	0.153	0.527	0.373	0.290	0.990	0.612	0.786
CR1 rs6701713 (A allele, MA)	0.299	0.201	0.279	0.671	0.385	0.567	0.397	0.503	0.043	0.360	0.761	0.491
EPHA1 rs11767557 (C allele, MA)	0.043	0.272	0.784	0.881	0.544	0.98	0.308	0.305	0.072	0.124	0.520	0.012
EPHA1 rs11771145 (A allele, MA)	0.813	0.496	0.924	0.406	0.606	0.476	0.480	0.916	0.101	0.541	0.432	0.062
HLA-DRB5/HLA-DRB1 rs9271192 (C allele, MA)	0.663	0.691	0.796	0.721	0.653	0.789	0.469	0.292	0.992	0.728	0.411	0.533
MS4A4A-MS4A6A rs4938933 (C allele, MA)	0.491	0.598	0.992	0.572	0.936	0.844	0.748	0.784	0.739	0.582	0.784	0.496
MS4A4A-MS4A6A rs983392 (G allele, MA)	0.184	0.479	0.715	0.903	0.901	0.348	0.666	0.869	0.945	0.721	0.869	0.764
PICALM rs10792832 (A allele, MA)	0.366	0.532	0.392	0.706	0.737	0.863	0.764	0.922	0.318	0.778	0.179	0.809
PICALM rs3851179 (T allele, MA)	0.432	0.532	0.346	0.628	0.772	0.811	0.674	0.78	0.394	0.863	0.244	0.712

PTK2B rs28834970 (C allele, MA)	0.533	0.109	0.671	0.090	0.672	0.198	0.995	0.614	0.791	0.478	0.959	0.503
SORL1 rs11218343 (C allele, MA)	0.246	1.000	1.000	0.194	1	1	0.242	0.415	0.031	0.031	1.000	0.412
TREM1 rs6910730 (G allele, MA)	0.314	0.426	0.442	0.964	1	0.22	0.492	0.594	0.658	0.165	0.181	0.430
TREM2 rs75932628 (T allele, MA)	1.000	-	0.254	1.000	1	1	0.420	1	0.466	1.000	0.373	0.449
TREML2 rs3747742 (C allele, MA)	0.284	0.716	0.828	0.930	0.737	0.863	0.039	0.013	0.472	0.253	0.500	0.023
APOEε2	0.306	0.713	0.359	0.862	0.446	0.205	0.725	0.933	0.286	0.320	0.561	0.097
APOEε4	0.468	0.705	0.395	0.176	1	0.771	0.459	0.434	0.455	0.829	0.434	0.917
Total ApoJ (g/L)	0.282	0.571	0.888	0.620	0.608	0.820	0.711	0.953	0.364	0.432	0.107	0.858
VLDL ApoJ (µg/mmol chol)	0.815	1.000	0.064	0.712	0.388	0.033	0.367	0.302	0.624	0.664	0.827	0.269
LDL ApoJ (µg/mmol chol)	0.511	0.849	0.033	0.223	0.737	0.022	0.513	0.067	0.194	0.497	0.253	0.432
HDL ApoJ (µg/mmol chol)	0.615	0.285	0.104	0.181	0.374	0.306	0.419	0.648	0.244	0.484	0.031	0.872
Total ApoE (mg/L)	0.778	0.201	0.014	0.121	0.055	0.943	0.237	0.344	0.754	0.457	0.933	0.924
VLDL ApoE (µmol / mol chol)	0.506	0.338	0.598	0.211	0.891	0.759	0.481	0.790	0.756	0.083	0.562	0.701
LDL ApoE (µmol / mol chol)	0.833	0.003	0.408	0.178	0.334	0.631	0.407	0.403	0.816	0.689	0.756	0.785
HDL ApoE (µmol / mol chol)	0.537	0.256	0.044	0.096	0.087	0.654	0.703	0.898	0.413	0.586	0.498	0.508

ST1. Association of SNPs, circulating ApoE and ApoJ levels, and demographic variables with CAA- MRI common features. Data displayed are p-values. cSS: cortical Superficial Siderosis; distr.: distribution; EPVS: Enlarged Perivascular Spaces; BG: Basal Ganglia; CSO: Centrum Semiovale; BG: Basal Ganglia; CMB: Cerebral Microbleedings; WMH: White

Supplemental Figure 1



SF1. Genotype frequency of the SNPs associated with the CAA-SVD burden score using the additive model. The genetic risk factor associated with a higher score is represented in darker grey, whereas the protective factor is represented in lighter grey. Genotype frequency is expressed as a percentage in each category of the score (0-6).

Supplemental Table 2

		Total ApoJ (g/L) N=59	VLDL ApoJ (µg/mmol chol) N= 60	LDL ApoJ (µg/mmol chol) N=60	HDL ApoJ (µg/mmol chol) N=60
Sex	M	0.183 ± 0.060	177.99 [113.78 – 217.36]	60.78 [4.34 – 93.81]	450.98 [0 – 881.95]
	F	0.198 ± 0.062	198.21 [163.68 – 270.77]	88.96 [31.75 – 127.43]	756.79 [472.94 – 1048.78]
	<i>p</i>	0.369	0.070	0.104	0.127
HT	No	0.183 ± 0.064	202.46 [136.30 – 271.21]	63.61 [10.38 – 131.55]	762.35 [472.29 – 1150.24]
	Yes	0.198 ± 0.057	179.26 [145.10 – 230.58]	84.10 [52.14 – 118.75]	613.75 [57.84 – 901.28]
	<i>p</i>	0.363	0.247	0.680	0.145
DM	No	0.186 ± 0.061	194.51 [143.29 – 252.64]	71.89 [25.95 – 127.25]	762.35 [239.62 – 1039.01]
	Yes	0.212 ± 0.048	187.10 [117.76 – 252.07]	59.51 [1.01 – 111.45]	498.90 [0 – 852.09]
	<i>p</i>	0.288	0.645	0.202	0.240
DL	No	0.190 ± 0.060	192.66 [138.30 – 235.21]	68.55 [15.77 – 119.17]	739.65 [0 – 1004.24]
	Yes	0.192 ± 0.068	195.71 [166.46 – 292.48]	71.89 [3.85 – 141.09]	665.63 [238.65 – 971.54]
	<i>p</i>	0.876	0.405	0.633	0.887
Age	<i>r</i>	0.013	0.084	-0.183	- 0.073
	<i>p</i>	0.920	0.521	0.163	0.578

ST2. Association of demographic and clinical features with ApoJ levels. Total ApoJ is expressed as g/L and ApoJ in lipoprotein fractions is expressed as µg of ApoJ per mmol of cholesterol in each lipoprotein. M: Male; F: Female; HT: Hypertension; DM: Diabetes Mellitus; DL: Dyslipidemia.

Supplemental Table 3

		Total ApoJ (g/L) N=59	VLDL ApoJ (μ g/mmol chol) N= 60	LDL ApoJ (μ g/mmol chol) N=60	HDL ApoJ (μ g/mmol chol) N=60
rs11136000	C	0.189 \pm 0.058	189.01 [146.14 – 260.64]	62.05 [11.04 – 125.20]	614.68 [0 – 950.47]
	T (MA)	0.200 \pm 0.066	200.58 [139.71 – 268.94]	90.98 [58.70 – 123.61]	795.87 [586.48 – 1065.01]
	<i>p</i>	0.351	0.653	0.151	0.012 *
rs7012010	T	0.195 \pm 0.061	190.81 [144.34 – 256.35]	78.11 [39.50 – 111.87]	751.23 [330.83 – 1028.20]
	C (MA)	0.188 \pm 0.061	194.51 [144.05 – 292.48]	63.61 [9.72 – 129.29]	644.44 [0 – 971.54]
	<i>p</i>	0.554	0.551	0.657	0.241
rs9331888	C	0.195 \pm 0.063	189.01 [142.53 – 267.55]	72.86 [13.57 – 127.08]	728.08 [238.65 – 977.89]
	G (MA)	0.185 \pm 0.056	202.46 [161.32 – 266.45]	70.61 [42.22 – 109.06]	613.75 [13.22 – 995.16]
	<i>p</i>	0.456	0.496	0.907	0.558
rs9331896	T	0.187 \pm 0.061	189.01 [145.10 – 264.09]	63.61 [12.31 – 126.14]	644.44 [13.22 – 961.01]
	C (MA)	0.203 \pm 0.059	200.58 [142.53 – 267.55]	84.10 [46.50 – 122.02]	795.87 [549.54 – 1065.01]
	<i>p</i>	0.167	0.738	0.408	0.056 #

ST3. Association of CLU SNPs with ApoJ levels. Total ApoJ is expressed as g/L and ApoJ in lipoprotein fractions is expressed as μ g of ApoJ per mmol of cholesterol in each lipoprotein. MA: Minor Allele. * $p < 0.05$; # $p < 0.1$.

Supplemental Table 4

CAA	Total ApoE (mg/L) N=59	VLDL ApoE (μ mol / mol chol) N= 60	LDL ApoE (μ mol / mol chol) N= 60	HDL ApoE (μ mol / mol chol) N= 60	
Sex	M	45.39 \pm 19.25	345.16 [162.16 – 691.93]	28.93 [12.20 – 43.99]	318.35 \pm 202.17
	F	46.33 \pm 15.51	274.69 [90.13 – 657.25]	46.12 [25.74 – 64.51]	354.98 \pm 225.31
	<i>p</i>	0.839	0.524	0.056	0.532
HT	No	42.75 \pm 11.30	366.44 [153.65 – 704.21]	39.99 [19.45 – 68.49]	353.13 \pm 223.92
	Yes	50.50 \pm 20.51	290.92 [159.67 – 634.64]	35.22 [19.88 – 56.65]	325.49 \pm 215.99
	<i>p</i>	0.086	0.950	0.732	0.634
DM	No	46.37 \pm 16.91	393.67 [163.38 – 704.21]	39.44 [21.69 – 65.46]	342.40 \pm 229.57
	Yes	48.03 \pm 20.21	183.82 [138.69 – 546.96]	30.32 [14.17 – 58.79]	347.32 \pm 161.28
	<i>p</i>	0.824	0.240	0.528	0.957
DL	No	46.78 \pm 15.36	380.06 [154.16 – 696.21]	39.01 [21.12 – 58.38]	336.31 \pm 241.43
	Yes	42.23 \pm 20.47	273.11 [163.90 – 697.77]	35.22 [14.99 – 85.01]	358.35 \pm 187.84
	<i>p</i>	0.363	0.677	0.965	0.731
Age	<i>r</i>	-0.028	-0.084	-0.243	0.048
	<i>p</i>	0.834	0.523	0.061	0.716

ST4. Association of demographic and clinical features with ApoE levels. Total ApoE is expressed as mg/L and ApoE in lipoprotein fractions is expressed as μ mol of ApoE per mol of cholesterol in each lipoprotein. HT: Hypertension; DM: Diabetes Mellitus; DL: Dyslipidemia.

Supplemental Table 5

CAA	Total ApoE (mg/L) N=59	VLDL ApoE (μ mol / mol chol) N= 60	LDL ApoE (μ mol / mol chol) N= 60	HDL ApoE (μ mol / mol chol) N= 60	
APOE ϵ 2	No	43.16 \pm 14.02	287.58 [143.76 – 634.64]	35.07 [17.64 – 51.61]	323.57 \pm 211.25
	Yes	67.04 \pm 21.56	407.84 [200.08 – 908.61]	67.48 [58.79 – 171.32]	477.68 \pm 219.04
	<i>p</i>	<0.001 ***	0.377	0.001 **	0.076 #
APOE ϵ 4	No	48.59 \pm 17.17	363.52 [151.26 – 697.77]	38.57 [20.21 – 67.48]	355.04 \pm 228.17
	Yes	36.82 \pm 11.73	284.09 [120.15 – 504.03]	36.76 [20.33 – 46.34]	292.80 \pm 163.54
	<i>p</i>	0.024 *	0.641	0.484	0.363

ST5. Association of ApoE genotype with ApoE levels. Total ApoE is expressed as mg/L and ApoE in lipoprotein fractions is expressed as μ moles of ApoE per mol of cholesterol in each lipoprotein. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.1$.







2. Comparison of Plasma Lipoprotein Composition and Function in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease

Biomedicines (2021)

January 12; 9, 72. Doi: [10.3390/biomedicines9010072](https://doi.org/10.3390/biomedicines9010072)

Article

Comparison of Plasma Lipoprotein Composition and Function in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease

Anna Bonaterra-Pastra ¹, Sofia Fernández-de-Retana ¹, Andrea Rivas-Urbina ², Núria Puig ², Sònia Benítez ², Olalla Pancorbo ³, David Rodríguez-Luna ³, Francesc Pujadas ⁴, Maria del Mar Freijo ⁵, Silvia Tur ⁶, Maite Martínez-Zabaleta ⁷, Pere Cardona Portela ⁸, Rocío Vera ⁹, Lucía Lebrato-Hernández ¹⁰, Juan F. Arenillas ^{11,12}, Soledad Pérez-Sánchez ¹³, Joan Montaner ^{1,10,13,14}, Jose Luis Sánchez-Quesada ^{2,15,*} and Mar Hernández-Guillamon ^{1,*}

- ¹ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain; annabonaterpa95@gmail.com (A.B.-P.); sofia.fernandezderetana@gmail.com (S.F.-d.-R.); montaner.villalonga@gmail.com (J.M.)
 - ² Cardiovascular Biochemistry Group, Research Institute of the Hospital de Sant Pau (IIB Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; arivas@santpau.cat (A.R.-U.); npuigg@santpau.cat (N.P.); sbenitez@santpau.cat (S.B.)
 - ³ Stroke Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, 08035 Barcelona, Spain; olallaprwhir@gmail.com (O.P.); rodriguezluna@vhebron.net (D.R.-L.)
 - ⁴ Dementia Unit, Neurology Department, Vall d'Hebron Hospital, 08035 Barcelona, Spain; 15078fpm@comb.cat
 - ⁵ Neurovascular Group, Biocruces Health Research Institute, 48903 Barakaldo, Spain; MARIADELMAR.FREIJOGUERRERO@osakidetza.net
 - ⁶ Department of Neurology, Son Espases University Hospital, 07010 Palma de Mallorca, Spain; silvia.tur@ssib.es
 - ⁷ Department of Neurology, Donostia University Hospital, 20014 San Sebastián, Spain; mariateresa.martinezzaleta@osakidetza.net
 - ⁸ Department of Neurology, Bellvitge University Hospital, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain; pcardonap@bellvitgehospital.cat
 - ⁹ Stroke Unit-Department of Neurology, Ramon y Cajal University Hospital, 28034 Madrid, Spain; rovera78@hotmail.com
 - ¹⁰ Stroke Unit, Virgen del Rocío University Hospital, 41013 Sevilla, Spain; lucia.lebrato.hdez@gmail.com
 - ¹¹ Stroke Program, Department of Neurology, Hospital Clínico Universitario, 47703 Valladolid, Spain; juanfarenilas@gmail.com
 - ¹² Clinical Neurosciences Research Group, Department of Medicine, University of Valladolid, 47702 Valladolid, Spain
 - ¹³ Department of Neurology, Virgen Macarena University Hospital, 41009 Sevilla, Spain; soledad.perez.sanchez@gmail.com
 - ¹⁴ Stroke Research Program, Insitute of Biomedicine of Sevilla, IBI5, 41013 Sevilla, Spain
 - ¹⁵ CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: jsanchezq@santpau.cat (J.L.S.-Q.); mar.hernandez.guillamon@vhir.org (M.H.-G.)



Citation: Bonaterra-Pastra, A.; Fernández-de-Retana, S.; Rivas-Urbina, A.; Puig, N.; Benítez, S.; Pancorbo, O.; Rodríguez-Luna, D.; Pujadas, F.; del Mar Freijo, M.; Tur, S.; et al. Comparison of Plasma Lipoprotein Composition and Function in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease. *Biomedicines* **2021**, *9*, 72. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010072>

Received: 19 November 2020

Accepted: 8 January 2021

Published: 12 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cerebral amyloid angiopathy (CAA) refers to beta-amyloid (A β) deposition in brain vessels and is clinically the main cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH). A β can also accumulate in brain parenchyma forming neuritic plaques in Alzheimer's disease (AD). Our study aimed to determine whether the peripheral lipid profile and lipoprotein composition are associated with cerebral beta-amyloidosis pathology and may reflect biological differences in AD and CAA. For this purpose, lipid and apolipoproteins levels were analyzed in plasma from 51 ICH-CAA patients (collected during the chronic phase of the disease), 60 AD patients, and 60 control subjects. Lipoproteins (VLDL, LDL, and HDL) were isolated and their composition and pro-/antioxidant ability were determined. We observed that alterations in the lipid profile and lipoprotein composition were remarkable in the ICH-CAA group compared to control subjects, whereas the AD group presented no specific alterations compared with controls. ICH-CAA patients presented an atheroprotective profile, which consisted of lower total and LDL cholesterol levels. Plasma from chronic ICH-CAA patients also showed a redistribution of ApoC-III from HDL to VLDL and a higher ApoE/ApoC-III ratio in HDL. Whether these alterations reflect a protective response or have a causative effect on the pathology requires further investigation.

Keywords: cerebral amyloid angiopathy; Alzheimer’s disease; lipoprotein composition; lipid profile; apolipoproteins

1. Introduction

Cerebral beta-amyloidosis is defined as the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) in the brain and is a principal neuropathological feature in Alzheimer’s disease (AD) and in the most common form of sporadic cerebral amyloid angiopathy (CAA). AD is the most common cause of dementia worldwide whereas CAA is the most frequent cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) in adults over 55-60 years of age [1,2]. After symptomatic ICH, cognitive deterioration is a relevant clinical manifestation of CAA, independent of AD [3]. CAA is present in nearly all brains with AD [4], although advanced CAA is only present in approximately 25% of AD brains [5]. Even though there is a high overlap between the two diseases, in terms of $A\beta$ level generation and clearance pathways, the pathological mechanisms and clinical presentation differ. While $A\beta$ accumulates in cerebral blood vessels replacing smooth muscle cells and inducing vascular degeneration compromising the vessel functionality and integrity in CAA, in AD $A\beta$ accumulates in brain parenchyma being the core of neuritic plaques contributing to the loss of synapses and neurons [4]. $A\beta$ peptides are caused by the sequential processing of amyloid precursor protein (APP) by β -secretase and then by γ -secretase, mainly generating peptides consisting of 40 or 42 amino acids ($A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$, respectively). $A\beta_{42}$ is the main component of amyloid plaques in sporadic AD brains, while $A\beta_{40}$ is the predominant component in vascular deposits in CAA [6,7]. Actually, $A\beta_{40}$ levels in cerebrospinal fluid (CSF) have been described to be lower in CAA patients than in AD, whereas $A\beta_{42}$ is decreased in both [8]. Beyond the $A\beta$ peptide length, the reasons explaining the localization of $A\beta$ peptides in CAA and AD, which involve a different clinical phenotype, are still unidentified. Even though both pathologies present distinctive symptomatology, there are no biomarkers to distinguish them in the clinical practice yet [4]. In this context, cerebral $A\beta$ deposition, parenchymal, and vascular, can be detected by amyloid positron emission tomography (PET) imaging. However, PET’s diagnostic accuracy for CAA is still limited [9].

It is known that tight control of cholesterol is essential for correct brain function [10] and growing evidence shows that cholesterol metabolism in the brain is closely related to the onset of neurocognitive impairment [11]. Cholesterol levels in AD have been extensively studied, and although there are conflicting data [12], a meta-analysis in 2017 reported that high levels of total cholesterol in midlife and early states of aging are significantly associated with a higher risk of developing AD [13]. In this context, lipid-lowering statins have been reported to reduce the risk of AD and decrease its progression [14]. In contrast, it has been demonstrated that low triglycerides, total and LDL cholesterol, and high HDL cholesterol levels, are associated with an increased probability of ICH occurrence, including lobar ICH [15–17]. Even though statin treatment as such does not increase the risk of experiencing ICH, it has been suggested that in patients with prior ICH history, this treatment could eventually promote another hemorrhagic event [16,18].

On the other hand, the APOE locus, which encodes ApoE, is the genetic factor most associated with sporadic AD and CAA [19–21]. Indeed, the Apo ϵ 4 allele is a major risk factor for both AD and CAA and it is associated with neuritic and vascular $A\beta$ deposition [22–24]. In contrast, the Apo ϵ 2 allele is protective in AD [25] but a risk factor for ICH attributed to CAA [23,26]. This difference regarding the genetic association of the Apo ϵ 2 supports a functional involvement of lipid metabolism in the transport and localization of $A\beta$ within the brain, as the involvement of the Apo ϵ 2 allele has been related to a major clearance across the blood-brain barrier (BBB) [27]. In addition to the ApoE genotype, polymorphisms in other genes related to lipid metabolism, such as ApoJ, ApoC-III and ApoA-I, have also been reported as genetic determinants of AD risk [28–30].

The relationship of lipoproteins with pathological processes is not only related to their concentration but also depends on their qualitative characteristics. Lipoproteins are not homogeneous entities but are formed by multiple heterogeneous particles differing in their relative content of both lipids and proteins [31]. Regarding the protein moiety of lipoproteins, the only common molecule in all very-low-density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) particles is ApoB-100, whereas ApoA-I is the only protein contained in all the high-density lipoprotein (HDL) particles [32]. However, particularly in HDL, there are a plethora of other apolipoproteins and enzymes with different functions, whose content varies among lipoproteins and confers them in different capacities [33].

In an atherosclerotic disease context, the ability of lipoproteins, mainly HDL and LDL, to enter the arterial wall is well known. As opposed to LDL, which mainly plays a proinflammatory role, the function of HDL includes antioxidant and anti-inflammatory actions protecting the arterial wall from deleterious effects [33]. This function is mediated by apolipoproteins such as ApoA-I or enzymes such as paraoxonase-1 (PON1), lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), or lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂). This implication of lipoproteins in the arterial wall can also have an effect on brain vessel stability in conditions such as CAA. In addition, some apolipoproteins, such as ApoE and ApoJ, are the main transporters of lipids in the brain [10,34], and together with ApoA-I, they can also modulate cerebral A β aggregation, deposition, and distribution [27,35–39]. This suggests that alterations in the composition and function of plasma lipoproteins could have a direct role in the formation of amyloid deposits in the arterial wall of brain arteries and/or parenchyma. Based on this assumption, our aim was to analyze the composition and function of lipoproteins isolated from AD or ICH-CAA plasma patients to assess possible abnormalities compared with lipoproteins from sex- and age-matched healthy subjects.

2. Experimental Section

2.1. Study Population

The population studied in this project consisted of 51 patients who had presented ICH with clinical suspicion of CAA, 60 AD patients, and 60 gender- and age-matched control subjects. The 51 ICH-CAA patients were recruited during a follow-up visit in neurology or stroke units of 10 different Spanish centers. All AD patients and controls were recruited at Vall d'Hebron University Hospital (VHUH).

ICH-CAA patients were >55 years old and had suffered at least one lobar intracerebral hemorrhage. Patients who exhibited any deep intracerebral hemorrhage, presented microbleeds in the basal ganglia, internal or external capsule, thalamus or brainstem, or were being treated with anticoagulant therapy were excluded. The diagnosis was made by magnetic resonance imaging (MRI) acquired following the clinical protocol in each center. In all cases, MRI examinations were obtained using a 1.5-T whole-body scanner. Images obtained included axial T2-weighted turbo spin-echo, axial T1-weighted spin-echo, turbo fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), and axial T2-weighted susceptibility-based echo-planar gradient-echo sequence. All MRI images were evaluated in VHUH by the same neuroradiologist to avoid bias among the different centers. ICH-CAA patients accomplished a CAA diagnosis according to the modified Boston criteria [40] and did not present a diagnosis of dementia at the time of recruitment. According to the modified Boston criteria, 11 patients were classified as possible CAA, 37 probable CAA, and 3 probable CAA with supporting pathology.

The recruited AD patients presented sporadic probable Alzheimer's disease, according to NIA-AA criteria [41], with mild-to-moderate dementia based on the mini-mental state examination [42]. The MMSE score for the AD cohort was 18 ± 4 . AD patients did not present a history of stroke before recruitment. The control subjects were healthy acquaintances or companions of the patients, who were >55 years old and had no history of stroke or dementia (MMSE = 30 ± 0).

The data obtained from the whole cohort included patient coding, inclusion date, demographic characteristics (age, sex), relevant vascular risk factors (HTA, DM, dyslipidemia), and medication, including statin intake. Clinical and anthropometric data of all groups are shown in Table 1. Blood samples of all groups were collected at a follow-up visit. Samples from the ICH-CAA group were obtained at 11 ± 18 months after the last ICH.

Table 1. Demographic and clinical characteristics.

Parameters	Control	ICH-CAA	AD	<i>p</i> -Value
Age	76.0 [71.0–81.0]	77.0 [72.0–79.0]	77.0 [72.3–81.0]	0.755
Gender (F)	34 (56.7%)	32 (62.7%)	42 (70%)	0.317
Hypertension	34 (63.0%)	22 (43.1%)	27 (61.4%)	0.083
Diabetes	7 (13.0%)	5 (9.8%)	7 (15.9%)	0.672
Dyslipidemia	19 (35.2%)	17 (34.7%)	22 (51.2%)	0.189
ApoE2	7 (11.7%)	6 (11.8%)	2 (3.3%)	0.181
ApoE4	10 (16.7%)	11 (21.6%)	28 (46.7%) ^{§, **}	0.001

Age is expressed as median [interquartile range]. ** $p < 0.001$ vs. the control group; [§] $p < 0.05$ vs. the ICH-CAA group. Bold numbers indicate statistically significant differences.

The study was approved by the Clinical Investigation Ethical Committee of the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain (PR(AG)326/2014) and had the approval of the Ethical Committees of all the participating centers. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Ten mL of blood in EDTA-containing Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was collected from each participant. Blood was centrifuged at 4 °C for 15 min at 2500 rpm and plasma was immediately aliquoted and frozen at −80 °C. APOE genotypes (rs429358 and rs7412) were determined by allelic discrimination using the TaqMan[®] Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the SNP genotyping mixes C-3084793 and C-904973 (Applied Biosystems) in a Rotor-Gene 6000 Real-Time PCR analyzer (Corbett Life Sciences, Valencia, CA, USA).

2.2. Plasma Determinations

The lipid profile, total apolipoproteins, Lp-PLA₂ activity, LDL size, and HDL subfraction proportion were determined in plasma obtained in EDTA-containing Vacutainer tubes. The lipid profile included total cholesterol, triglycerides, and VLDL, LDL, and HDL cholesterol. The cholesterol in the lipoprotein fractions was routinely quantified using a direct HDL-cholesterol method (HDL-C plus) or by ultracentrifugation when the TG concentration was higher than 3 mmol/L, according to the National Cholesterol Education Program [43]. All these determinations were performed in the Clinical Biochemistry Unit of the VHUH in an AU 5800 autoanalyzer (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) using reagents from Beckman Coulter. Apolipoproteins B, A-I, A-II, E, and C-III were quantified in the Research Institute of the Hospital de Sant Pau in a Cobas 6000/c501 autoanalyzer using reagents from Roche Diagnostics (ApoB, ApoA-I, Basel, Switzerland) and Kamiya Biomedical Company (ApoA-II, ApoE, ApoC-III, Seattle, WA, USA). ApoJ was determined by ELISA in a subgroup of the cohort (30 controls, 22 ICH-CAA, and 30 AD) (Mabtech, Stockholm, Sweden). The LDL size and HDL subfraction ratio were evaluated by non-denaturing polyacrylamide gradient (2.5–16%) gel electrophoresis (GGE), as described previously [44]. Briefly, the LDL size was measured using a homemade standard containing four bands of LDL, and the HDL_{2/3} ratio was calculated from the intensity of HDL 2 and HDL 3 bands. Lp-PLA₂ activity was measured using 2-tio-PAF (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) as a substrate [45] according to the manufacturer's instructions. The distribution of Lp-PLA₂ between lipoprotein fractions was assessed by precipitating ApoB-containing lipoproteins from plasma with dextran sulfate [46].

2.3. Lipoprotein Composition

Lipoproteins were isolated by flotation sequential ultracentrifugation according to density: VLDL (1.006–1.019 g/mL), LDL (1.019–1.063 g/mL), and HDL (1.063–1.210 g/mL). Their lipid and apolipoprotein composition was determined by measuring the content of cholesterol, triglycerides, ApoB, ApoA-I (Roche Diagnostics), phospholipids, free cholesterol (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan), ApoA-II, ApoE, and ApoC-III (Kamiya Biomedicals, Seattle, WA, USA) in an autoanalyzer Cobas 6000/c501. ApoJ content in isolated lipoproteins was evaluated using commercial ELISA (Mabtech, Stockholm, Sweden). Before ELISA quantification, lipoprotein samples were diluted to the same cholesterol concentration.

2.4. LDL and HDL Susceptibility to Oxidation

Lipoproteins were dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 by gel filtration chromatography in a PD10 column (Sephadex G-25, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Susceptibility to oxidation was evaluated by monitoring the formation of conjugated diene formation at 234 nm in a Synergy HT spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). LDL or HDL at 0.15 mM cholesterol were incubated with 5 μ M CuSO₄, and the lag phase time of the oxidation kinetics was determined [47].

2.5. Antioxidant Capacity of HDL

HDL at 0.15 mM cholesterol was incubated with a standard LDL (obtained from a pool of normolipidemic plasma and stored with 10% sucrose at -80° C), and oxidation was induced by adding 5 μ M CuSO₄. Conjugated diene formation was monitored as described in the previous section. The results are expressed as the capacity of HDL to prolong the lag phase time of the standard LDL alone, as described previously [48].

2.6. Statistical Analysis

All the data were analyzed by comparing the three groups: controls, ICH-CAA, and AD patients. The association of categorical variables with the diagnostic groups was studied using contingency tables and a Chi-squared test using the Pearson *p*-value. Significant *p*-values were adjusted by the Bonferroni test when necessary. The distribution of the continuous variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. If the distribution was normal, one-way ANOVA and Bonferroni's test for multiple comparisons were performed. If the distribution was not normal, an independent-samples Kruskal-Wallis test with Dunn-Bonferroni adjustment for multiple comparisons was applied. A Forward LR binary logistic regression using the significant variables after multiple comparisons for each study (lipidic profile, each lipoprotein composition, ApoJ distribution, and lipoprotein size), ApoE4 genotype, sex, and age were assessed. The odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for the effect on diagnosis were estimated using binary logistic regression analysis. Data are expressed as the mean \pm SD for normal distributions or as the median [interquartile range] for non-normal distributions. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Lipid Profile

All groups presented similar clinical characteristics with a low incidence of diabetes and relatively frequent dyslipidemia and hypertension (Table 1). Statin intake was similar among groups (Ctrl: 12 (21.8%), ICH-CAA: 17 (31.5%), AD: 14 (31.1%), *p*-value: 0.461). Table 2 shows the lipid profile and apolipoprotein concentration in the plasma from the three groups. No significant difference was observed between the control group and AD patients. In contrast, ICH-CAA subjects showed lower levels of ApoA-II than controls, and differences were also found between ICH-CAA and AD patients, with lower levels of total cholesterol and LDL-c in the ICH-CAA group. Although ApoE levels were significantly different when comparing all groups, multiple comparison analysis did not allow reaching statistical significance between cohorts. Both ApoA-II and LDL-c levels

remained significantly lower in the ICH-CAA patients after adjustment for the ApoE4 genotype by binary logistic regressions (ApoA-II (dg/L): OR: 0.538 [0.346–0.835], $p = 0.006$; and LDL-c (mg/dL): OR: 1.016 [1.005–1.027], $p = 0.004$) (Supplemental Table S1).

Table 2. Lipid profile and apolipoprotein concentration in plasma.

Parameters	Controls	ICH-CAA	AD	<i>p</i> -Value
Total cholesterol	228.00 [199.50–261.50]	207.00 [185.00–226.00] *	230.00 [198.00–283.00] §	0.006
HDL-c	58.30 ± 11.32	58.57 ± 13.09	60.52 ± 15.98	0.642
LDL-c	145.00 [108.00–172.20]	126.00 [114.00–139.60]	143.70 [117.90–190.65] §	0.004
VLDL-c	24.80 [18.00–32.00]	21.00 [16.60–26.80]	21.50 [17.50–29.00]	0.150
Triglycerides	122.00 [91.50–162.50]	105.00 [83.00–134.00]	108.50 [87.00–145.00]	0.133
ApoA-I	1.744 ± 0.266	1.707 ± 0.329	1.670 ± 0.284	0.399
ApoA-II	0.416 [0.337–0.460]	0.340 [0.260–0.423] *	0.400 [0.340–0.440]	0.010
ApoB	1.095 [0.938–1.285]	0.995 [0.895–1.095]	1.070 [0.900–1.300]	0.052
ApoC-III	0.126 ± 0.054	0.116 ± 0.045	0.107 ± 0.049	0.112
ApoE	0.053 ± 0.016	0.045 ± 0.018	0.053 ± 0.016	0.030
ApoJ	0.218 ± 0.059	0.193 ± 0.060	0.211 ± 0.054	0.079

Lipids are expressed as mg/dL and apolipoproteins are expressed as g/L. * $p < 0.05$ vs. the control group; § $p < 0.05$ vs. the ICH-CAA group.

3.2. Prevalence of ApoE Genotypes

As expected, the AD group presented a higher incidence of the ApoE4 genotype than the control and ICH-CAA groups (Table 1 and Supplemental Figure S1). No difference in the frequency of the ApoE4 genotype was observed between ICH-CAA patients and control subjects. Regarding the distribution of the ApoE2 genotype, no statistically significant difference was observed among groups (Table 1 and Supplemental Figure S1).

3.3. Lipoprotein Composition

VLDL from ICH-CAA patients contained lower cholesterol (total and esterified) levels than those from control subjects and AD patients, and higher ApoC-III levels than those from AD patients (Table 3). These differences in the composition suggest larger VLDL particles in plasma from ICH-CAA patients. No difference was observed between plasma VLDL from AD patients and controls. After adjusting for the ApoE4 genotype, the esterified cholesterol levels remained significantly different between the ICH-CAA group and control (OR: 0.808 [0.683–0.956], $p = 0.013$); and ApoCIII levels between ICH-CAA group and AD (OR: 0.39 [0.184–0.829], $p = 0.014$) (Supplemental Table S2).

Table 3. VLDL composition.

Parameters	Controls	ICH-CAA	AD	<i>p</i> -Value
Cholesterol	20.15 [18.13–21.78]	17.70 [16.60–20.10] *	20.65 [18.00–22.70] §	0.001
Free cholesterol	6.65 [6.03–7.45]	6.30 [5.90–6.70]	6.80 [6.10–7.50] §	0.031
Esterified cholesterol	13.36 ± 1.90	12.12 ± 3.03 *	13.62 ± 2.92 §	0.008
Triglycerides	49.66 ± 4.79	50.73 ± 5.52	48.23 ± 6.07	0.056
Phospholipid	19.70 [18.33–20.48]	19.10 [18.30–20.20]	19.40 [18.53–20.70]	0.731
Protein	11.23 [10.59–11.90]	10.93 [9.87–12.10]	11.44 [9.89–12.75]	0.750
ApoB-100	10.07 [9.30–10.79]	9.60 [8.02–10.08]	10.20 [8.48–12.10]	0.149
ApoC-III	0.70 [0.50–1.00]	0.90 [0.40–1.30]	0.60 [0.23–0.85] §	0.022
ApoE	0.40 [0.13–0.68]	0.47 [0.20–0.80]	0.36 [0.17–0.68]	0.724

Data are expressed as the percentage of each component of the total lipoprotein mass. * $p < 0.05$ vs. the control group; § $p < 0.05$ vs. the ICH-CAA group.

No difference in LDL composition was observed among the studied groups (Table 4). Only a trend toward lower esterified cholesterol content in the ICH-CAA cohort compared to the control and AD groups was detected.

Table 4. LDL composition.

Parameters	Controls	ICH-CAA	AD	p-Value
Cholesterol	39.20 [38.10–40.30]	38.60 [36.50–40.40]	39.30 [38.10–40.25]	0.288
Free cholesterol	10.30 [9.70–10.68]	10.40 [9.80–10.80]	10.30 [9.65–10.68]	0.755
Esterified cholesterol	29.10 [28.28–29.88]	28.20 [26.70–30.00]	29.15 [28.13–29.90]	0.062
Triglycerides	7.65 [6.90–8.88]	8.40 [6.90–9.60]	7.70 [6.70–9.00]	0.334
Phospholipid	25.40 [24.70–25.98]	25.40 [24.88–26.00]	25.50 [24.80–26.00]	0.766
Protein	27.50 [26.95–28.38]	27.40 [26.60–28.40]	27.37 [26.76–28.24]	0.587
ApoB-100	27.37 [26.73–28.28]	27.43 [26.45–28.40]	27.24 [26.60–28.13]	0.723
ApoE	0.10 [0.05–0.20]	0.14 [0.09–0.21]	0.12 [0.06–0.18]	0.294

Data are expressed as the percentage of each component of the total lipoprotein mass.

Regarding the composition of HDLs, total and esterified cholesterol levels were increased in plasma from the ICH-CAA group compared with that from both the control and AD groups (Table 5), which is suggestive of the presence of more mature HDL particles in this group. Additionally, the ApoE level showed a trend to increase, whereas ApoC-III was decreased in ICH-CAA patients compared with controls and AD patients, respectively, resulting in a higher ApoE/ApoC-III ratio in the ICH-CAA cohort compared to controls. No difference was observed between AD patients and controls. After adjusting for the ApoE4 genotype, esterified cholesterol levels remained significantly different between ICH-CAA and both controls (OR: 1.583 [1.119–2.239], $p = 0.010$) and AD (OR: 0.525 [0.365–0.754], $p = 0.0005$), and ApoC-III levels also remained significantly different between ICH-CAA and controls (OR: 0.414 [0.221–0.772], $p = 0.006$) (Supplemental Table S3).

Table 5. HDL composition.

Parameters	Controls	ICH-CAA	AD	p-Value
Cholesterol	16.04 ± 1.61	17.06 ± 1.70 *	16.32 ± 1.42 [§]	0.003
Free cholesterol	3.10 [2.80–3.48]	3.30 [2.80–3.70]	3.20 [2.90–3.60]	0.487
Esterified cholesterol	12.92 ± 1.42	13.86 ± 1.30 *	13.08 ± 1.13 [§]	<0.001
Triglycerides	3.05 [2.70–3.80]	3.00 [2.00–4.00]	3.20 [2.53–3.90]	0.444
Phospholipid	28.67 ± 2.63	28.68 ± 2.36	29.06 ± 1.76	0.567
Protein	51.92 ± 2.82	51.08 ± 2.80	51.34 ± 2.17	0.214
ApoA-I	38.98 ± 3.10	39.11 ± 2.70	38.94 ± 2.65	0.948
ApoA-II	10.97 ± 1.86	10.44 ± 1.81	10.68 ± 1.87	0.318
ApoC-III	1.59 [0.93–2.00]	0.95 [0.60–1.35] *	0.98 [0.64–1.79]	0.003
ApoE	0.38 [0.21–0.50]	0.47 [0.26–0.80]	0.36 [0.21–0.46]	0.081
ApoE/ApoC-III	0.25 [0.13–0.39]	0.50 [0.25–0.92] *	0.28 [0.13–0.65]	0.007

Data are expressed as the percentage of each component of the total lipoprotein mass. * $p < 0.05$ vs. the control group; [§] $p < 0.05$ vs. the ICH-CAA group.

3.4. Apolipoprotein J Content in Lipoproteins

Levels of ApoJ were also quantified in a subgroup of patients with the aim of studying whether the distribution of this apolipoprotein among the different lipoproteins differed between the selected clinical groups. However, the results showed that the ApoJ content in each lipoprotein fraction was similar between groups (Table 6). A tendency toward higher ApoJ levels in LDL was found in AD patients when the three groups were analyzed. Indeed, ApoJ levels in LDL from AD patients were significantly higher than the corresponding levels in plasma from ICH-CAA patients when adjusted for the ApoE4 genotype (OR: 1.015 [1.002–1.027], $p = 0.019$) (Supplemental Table S4).

Table 6. ApoJ content in lipoproteins.

Parameters	Controls	ICH-CAA	AD	p-Value
ApoJ in HDL	988.07 ± 405.68	1106.81 ± 349.20	1000.17 ± 270.93	0.430
ApoJ LDL	97.46 [73.84–189.11]	104.27 [81.81–144.17]	146.54 [97.46–221.94]	0.064
ApoJ VLDL	218.64 [170.18–309.78]	249.60 [167.51–318.45]	223.08 [178.98–332.63]	0.782

Data are expressed as µg apoJ/mmol cholesterol.

3.5. Lipoprotein Size and Oxidation-Related Functions

GGE allows us to define the LDL subfraction phenotype of patients. LDL subfraction phenotype A (large LDL particles > 25.5 nm) is the usual phenotype present in normolipidemic healthy subjects, in contrast to phenotype B (small LDL particles < 25.5 nm), which is characteristic of hypertriglyceridemic subjects at high cardiovascular risk. GGE showed that LDL particles from AD patients were slightly smaller than LDL particles from the ICH-CAA group (Table 7), reflecting the differences in lipid profiles between the two groups. However, in all groups, including AD patients, the LDL subfraction phenotype was type A; therefore, it can be considered non-atherogenic. No differences in the HDL2/HDL3 ratio were observed among groups. Regarding Lp-PLA activity, in plasma from AD patients, a decrease in the relative proportion of this activity associated with HDL was observed. No difference was detected in either LDL or HDL susceptibility to oxidation or in the antioxidant capacity of HDL among groups. After adjusting for the ApoE4 genotype, both the LDL size and Lp-PLA relative activity remained significantly lower in the AD group when compared to ICH-CAA (OR: 0.55 [0.331–0.912], $p = 0.021$; OR: 0.962 [0.925–1], $p = 0.049$ (Supplemental Table S5).

Table 7. Lipoprotein size, Lp-PLA₂ activity and oxidative properties of LDL and HDL.

Parameters	Controls	ICH-CAA	AD	p-Value
LDL size (nm)	26.23 [25.83–26.89]	26.40 [25.90–26.86]	26.13 [25.52–26.50] [§]	0.020
Ratio HDL2/HDL3	0.86 [0.38–1.23]	0.96 [0.56–1.44]	0.91 [0.45–1.37]	0.611
Total Lp-PLA ₂ activity ¹	18.30 [15.40–22.55]	17.30 [14.17–21.80]	18.32 [16.10–21.45]	0.415
Lp-PLA ₂ activity in HDL ¹	7.85 [6.53–9.80]	8.18 [7.30–9.73]	7.75 [6.80–8.63]	0.381
Lp-PLA ₂ activity in HDL (%)	43.16 [36.97–52.18]	46.49 [42.09–54.55]	40.25 [35.83–48.24] [§]	0.029
HDL lag time (min)	25.04 ± 5.88	27.09 ± 4.85	25.71 ± 5.66	0.165
LDL lag time (min)	46.00 [38.71–51.93]	46.00 [38.50–50.60]	46.20 [40.18–54.5]	0.904
Antioxidant ability of HDL ²	121.48 ± 47.21	124.02 ± 50.73	105.95 ± 44.31	0.104

¹ µmol/min mL. ² percentage of increase in lag time. [§] $p < 0.05$ vs. the ICH-CAA group.

4. Discussion

This study was conducted to determine whether a complete peripheral lipid analysis in plasma can reveal functional or quantitative circulating markers associated with cerebral beta-amyloidosis pathology and/or reflect biological differences in AD and CAA patients.

Our results showed that alterations in the lipid profile and lipoprotein composition were more evident in ICH-CAA than in AD patients compared to sex- and age-matched control subjects. We found that the lipid profile of the AD cohort was very similar to that of the control subjects. In contrast, patients in a chronic phase after an ICH associated with CAA presented multiple differences, in both the basic lipid profile and lipoprotein composition, compared with control and AD subjects. Even though statin treatment can modify the lipid profile, no relationship was found between statin intake and diagnosis groups, implying that statin treatment did not have an important effect on the obtained results. In addition, the ApoE genotype frequency in our cohort was similar between controls and ICH-CAA patients; hence, differences found in the lipid profile of ICH-CAA patients cannot be attributed to the ApoE genotype either. From a cardiovascular risk point of view, the lipid profile of ICH-CAA subjects was rather atheroprotective, displaying lower levels of total and LDL cholesterol. Other potential cardiovascular risk factors, such as

hypertension and diabetes, were similar among groups, and smoking or sedentarism were not studied. This result agrees with previous findings reporting an association between total and LDL cholesterol and increased risk of ICH [12,15,16]. Actually, a prior study reported that a decline in total and LDL cholesterol occurs within 6 months preceding ICH [49]. Indeed, the ApoE2 genotype, which is a risk factor for ICH in CAA, is also associated with lower levels of LDL cholesterol [50]. Lower LDL cholesterol levels were described to be associated with hematoma growth and increased mortality after acute ICH for both lobar and deep localizations [51]. In addition, previous evidence showed that lower total cholesterol and higher HDL cholesterol levels were associated with the presence of specifically lobar cerebral microbleeds [52,53], a characteristic trait of CAA [54]. Since lipids are an essential complement of cellular membranes, it has been proposed that lower blood cholesterol levels and triglycerides may cause fragility and necrosis in endothelial and smooth muscle cells in arterial media, contributing to vessel rupture in patients with ICH or presenting with multiple CMB [16,55,56]. However, the exact pathological mechanisms are still unclear, and other possible explanations, such as the effect of cholesterol on platelet aggregability, are also plausible [51]. On the other hand, our data show that ApoA-II plasma levels were exclusively decreased in the ICH-CAA group, whereas the other apolipoproteins presented similar concentrations among groups. Only a few reports have studied ApoA-II in subjects with cognitive impairment, and the results are divergent. Whereas Song et al. reported that a low concentration of ApoA-II was associated with an increased risk for cognitive decline in normal individuals [57], Lehallier et al. described increased ApoA-II levels in patients with the progression of mild cognitive impairment to AD [58]. Further studies are necessary to confirm or refute whether ApoA-II levels in the blood are associated with the development or progression of CAA.

Regarding the lipoprotein composition, alterations in the lipid content of VLDL in ICH-CAA suggest larger particles. The mechanism leading to this higher size of VLDL is probably related to the increased ApoC-III content since this apolipoprotein is the main inhibitor of the enzyme lipoprotein lipase (LpL), which degrades VLDL triglycerides in the capillary endothelium [59]. Interestingly, increased ApoC-III in VLDL was accompanied by decreased ApoC-III bound to HDL, which may reflect a redistribution of this apolipoprotein among plasma lipoproteins in ICH-CAA patients. In addition, HDL particles from these patients presented a higher ApoE/ApoC-III ratio than those from controls and AD patients and, thus, being a potential biomarker for ICH-CAA. Besides, our data suggest that HDL from ICH-CAA are more mature particles with increased esterified cholesterol. Hence, from a cardiovascular point of view, HDL from ICH-CAA subjects, with more ApoE and less ApoC-III, would also be atheroprotective by enhancing reverse cholesterol transport [60–62], in accordance with the atheroprotective lipid profile found in plasma from ICH-CAA patients. Moreover, these data open the possibility that the alterations observed in ICH-CAA HDL particles, especially the increase in ApoE in relation to a decreased ApoC-III, could be a defensive response against the deposition of A β in the walls of the brain vasculature, which would be in line with recent results showing that ApoE-enriched HDL reduces CAA in an *in vitro* model [63].

Concerning lipoprotein composition in the AD cohort, ApoC-III levels in HDL also tended to be lower than in controls. Indeed, higher ApoC-III levels in HDL have been associated with lower dementia and AD risk [64]. We also found low content of Lp-PLA₂ activity in HDL from AD patients, which could suggest impaired anti-inflammatory function. The physiological implications of such observation in the context of AD are difficult to appraise. However, the antioxidative and anti-inflammatory enzymes transported by HDL play a key role in the maintenance of a systemic non-inflammatory status in blood. Therefore, this finding could be related to the concept that inflammation is a central mechanism in the development of AD [65], which would be reflected at a systemic level in decreased anti-inflammatory capacity of HDL.

We were particularly interested in studying the distribution of ApoJ in circulating lipoproteins because of its potential to participate in A β accumulation and clearance and

modulate the balance between A β levels in brain vessels and parenchymal plaques [66]. In addition, ApoJ is co-deposited with fibrillary A β in both parenchymal plaques and vascular A β deposits [67–70]. Therefore, we first analyzed the levels of circulating total ApoJ levels, although no statistically significant differences among groups were obtained. It is worth mentioning that previous studies have found increased ApoJ levels in the plasma of AD and ICH-CAA patients [71–73], but other studies have not confirmed such differences [64,74]. However, it has been proposed that ApoJ levels are associated with AD in an age-dependent manner, especially in individuals above 80 years old, as a protective response to brain injury [75], which could explain our results in a slightly younger cohort. Furthermore, ApoJ is a chaperone that interacts with A β and prevents its fibrillation and toxicity in vitro [36,76,77] and it is also involved in the clearance of A β across the BBB [37,38]. In this sense, we observed higher ApoJ levels in LDL from AD patients, which suggests a redistribution of ApoJ in lipoproteins in AD. Since it has been previously demonstrated that lipidated ApoJ has a major affinity for one of the receptors involved in A β clearance through the BBB (LRP-2) [78], the increase in ApoJ levels in LDL could be seen as a protective response to enhance parenchymal A β clearance. However, the meaning of our findings regarding abnormal ApoJ distribution in lipoproteins and their link to AD pathology warrants further research and confirmation in other cohorts.

The results obtained in this study do not allow us to consider these lipid-related variables as biomarkers for diagnosis or clinical follow-up in medical practice. Nonetheless, our data can provide some insights to elucidate the relevance of lipid metabolism in the cerebral amyloidosis process and cerebral vascular functionality, which could potentially help in the management and treatment of these diseases. In future studies, it would be interesting to evaluate plasma A β levels in the different lipoproteins and thereby extend our results. Analyzing the A β distribution among circulating lipoproteins could also deepen our understanding of the role and function of lipoproteins in cerebral beta-amyloidosis. Unfortunately, the A β levels in lipoproteins were too low to be detected in the samples used in this study.

The biological overlap between CAA and AD pathologies involves an intrinsic limitation to differentiate the cohorts of the study. Although AD patients and controls did not present a history of ICH, the lack of neuroimaging data in those cohorts could have masked the presence of CAA-related radiological markers. To overcome this limitation and define a clear CAA phenotype in comparison to other potential degrees of CAA pathology, we selected only patients with at least one lobar ICH (ICH-CAA cohort) and without microbleeds in deep cerebral structures nor diagnosis of dementia. Nevertheless, even if there were some common pathological features in the AD and ICH-CAA cohorts, it would not determine the clear and specific lipid profile signature found in the last group.

In addition, the comparison of the three cohorts of the study suggests the analysis of plasma biomarkers of patients who have suffered a symptomatic intracerebral hemorrhage with patients without stroke. We tried to overcome this limitation by selecting plasma samples from ICH-CAA patients in a chronic phase of the disease, avoiding changes in biomarkers due to the inflammatory process caused during the acute phase of the stroke.

It is also important to keep in mind that the data obtained in the ICH-CAA cohort may reflect pathological changes associated with the previous symptomatic hemorrhage within the brain rather than the deposition of A β along the cerebral vasculature. In fact, a similar lipid profile has been previously found in non-lobar ICH patients before and immediately after the hemorrhagic episode [15,16,49]. Therefore, lipid analysis of patients who have suffered an ICH independent of a CAA etiology in a chronic phase of the disease would serve to compare and reinterpret our results. Furthermore, our study presents other limitations. First, the sample size is small, which could be a cause of patient selection bias. Larger studies with a higher number of patients should be conducted to confirm our results. Second, the observational nature of our study does not allow us to discriminate whether the differences observed between groups are a cause, a consequence, or a response to the pathology.

5. Conclusions

Our data show that, unlike AD, the lipid profile and lipoprotein composition in samples from chronic ICH-CAA patients present numerous differences from those in control subjects. Specifically, we observed an atheroprotective profile associated with ICH-CAA diagnosis, which confirmed previous studies and consisted of lower blood total and LDL cholesterol levels. In this study, ICH-CAA patients also presented a redistribution of ApoC-III from HDL to VLDL and a higher ApoE/ApoC-III ratio in HDL. Whether the alterations observed in lipoproteins from the ICH-CAA cohort are a reflection of a protective response or have a causative effect requires further investigation.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/1/72/s1>. Table S1. Binary logistic regression for lipid profile and apolipoprotein concentration in plasma. Table S2. Binary logistic regression for VLDL composition. Table S3. Binary logistic regression for HDL composition. Table S4. Binary logistic regression for ApoJ content in lipoproteins. Table S5. Binary logistic regression for lipoprotein size. Figure S1. ApoE genotype.

Author Contributions: Conceptualization: M.H.-G. and J.L.S.-Q.; Methodology: A.B.-P., S.F.-d.-R., A.R.-U., N.P. and S.B.; Recruitment of patients: O.P., D.R.-L., F.P., M.d.M.F., S.T., M.M.-Z., P.C.P., R.V., L.L.-H., J.F.A., S.P.-S. and J.M.; Formal analysis: A.B.-P., M.H.-G. and J.L.S.-Q.; Writing—original draft preparation: A.B.-P.; Writing—review and editing: M.H.-G. and J.L.S.-Q.; Supervision: M.H.-G. and J.L.S.-Q.; Funding acquisition: M.H.-G. and J.L.S.-Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto de Salud Carlos III (co-financed by the European Regional Development Fund FEDER “Una manera de hacer Europa”), grant numbers PI13/00364, PI16/00471, PI14/01134 and PI17/00275. A.R.-U. was funded by Instituto de Salud Carlos III predoctoral contract FI17/00031. The Neurovascular Research Laboratory is part of the INVICTUS+ network, ISCIII, Spain [RD16/0019/0021]. J.L.S.-Q. is a member of the CIBER of Diabetes and Metabolism (CIBERDEM), ISCIII, Spain. M.H.-G. is supported by the Miguel Servet programme, ISCIII, Spain [CPH17/00010]. A.R.-U., N.P., S.B. and J.L.S.-Q. are members of the Quality Research Group 2017-SGR-1149 from Generalitat de Catalunya. A.R.-U., N.P., S.B. and J.L.S.-Q. are members of the Group of Vascular Biology from the Spanish Atherosclerosis Society.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Clinical Investigation Ethical Committee of the Vall d’Hebron University Hospital, Barcelona, Spain (PR(AG)326/2014), and had the approval of the Ethical Committees of all the participating centers. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vinters, H.V. Emerging Concepts in Alzheimer’s Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2015**, *10*, 291–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Charidimou, A.; Boulouis, G.; Gurol, M.E.; Ayata, C.; Bacskai, B.J.; Frosch, M.P.; Viswanathan, A.; Greenberg, S.M. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain* **2017**, *140*, 1829–1850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Arvanitakis, Z.; Leurgans, S.E.; Wang, Z.; Wilson, R.S.; Bennett, D.A.; Schneider, J.A. Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Cognitive Domains in Older Persons. *Ann. Neurol.* **2011**, *69*, 320–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Greenberg, S.M.; Bacskai, B.J.; Hernandez-Guillamon, M.; Pruzin, J.; Sperling, R.; van Veluw, S.J. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—One peptide, two pathways. *Nat. Rev. Neurol.* **2020**, *16*, 30–42. [[CrossRef](#)]
5. Ellis, R.J.; Olichney, J.M.; Thal, L.J.; Mirra, S.S.; Morris, J.C.; Beekly, D.; Heyman, A. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer’s disease: The CERAD experience, Part XV. *Neurology* **1996**, *46*, 1592–1596. [[CrossRef](#)]
6. Suzuki, N.; Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Ishibashi, Y.; Kitada, C.; Ihara, Y. High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol.* **1994**, *145*, 452–460.
7. Yamada, M. Cerebral amyloid angiopathy: Emerging concepts. *J. Stroke* **2015**, *17*, 17–30. [[CrossRef](#)]

8. Renard, D.; Castelnovo, G.; Wacongne, A.; Le Floch, A.; Thouvenot, E.; Mas, J.; Gabelle, A.; Labauge, P.; Lehmann, S. Interest of CSF biomarker analysis in possible cerebral amyloid angiopathy cases defined by the modified Boston criteria. *J. Neurol.* **2012**, *259*, 2429–2433. [[CrossRef](#)]
9. Banerjee, G.; Carare, R.; Cordonnier, C.; Greenberg, S.M.; Schneider, J.A.; Smith, E.E.; Van Buchem, M.; Van Der Grond, J.; Verbeek, M.M.; Werring, D.J. The increasing impact of cerebral amyloid angiopathy: Essential new insights for clinical practice. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2017**, *88*, 982–994. [[CrossRef](#)]
10. Wang, H.; Eckel, R.H. What are Lipoproteins doing in the Brain? *Trends Endocrinol Metab.* **2014**, *25*, 8–14. [[CrossRef](#)]
11. Loera-Valencia, R.; Goikolea, J.; Parrado-Fernandez, C.; Merino-Serrais, P.; Maioli, S. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer’s disease: Potential novel targets for treatment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *190*, 104–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Appleton, J.P.; Scutt, P.; Sprigg, N.; Bath, P.M. Hypercholesterolaemia and vascular dementia. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 1561–1578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Anstey, K.J.; Ashby-mitchell, K.; Peters, R. Updating the Evidence on the Association between Serum Cholesterol and Risk of Late-Life Dementia: Review and Meta-Analysis. *J. Alzheimer’s Dis.* **2017**, *56*, 215–228. [[CrossRef](#)]
14. Chu, C.S.; Tseng, P.T.; Stubbs, B.; Chen, T.Y.; Tang, C.H.; Li, D.J.; Yang, W.C.; Chen, Y.W.; Wu, C.K.; Veronese, N.; et al. Use of statins and the risk of dementia and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wang, X.; Dong, Y.; Qi, X.; Huang, C.; Hou, L. Cholesterol levels and risk of hemorrhagic stroke: A systematic review and meta-analysis. *Stroke* **2013**, *44*, 1833–1839. [[CrossRef](#)]
16. Ma, Y.; Li, Z.; Chen, L.; Li, X. Blood lipid levels, statin therapy and the risk of intracerebral hemorrhage. *Lipids Health Dis.* **2016**. [[CrossRef](#)]
17. Pezzini, A.; Grassi, M.; Iacoviello, L.; Zedde, M.; Marcheselli, S.; Silvestrelli, G.; DeLodovici, M.L.; Sessa, M.; Zini, A.; Paciaroni, M.; et al. Serum cholesterol levels, HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of intracerebral haemorrhage. The Multicenter Study on Cerebral Haemorrhage in Italy (MUCH-Italy). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2016**, *87*, 924–929. [[CrossRef](#)]
18. Endres, M.; Nolte, C.H.; Scheitz, J.F. Statin treatment in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* **2018**, *49*, 240–246. [[CrossRef](#)]
19. Schmechel, D.E.; Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Crain, B.J.; Hulette, C.M.; Joo, S.H.; Pericak-Vance, M.A.; Goldgaber, D.; Roses, A.D. Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9649–9653. [[CrossRef](#)]
20. Greenberg, S.M.; Rebeck, G.W.; Vonsattel, J.P.G.; Gomez-Isola, T.; Hyman, B.T. Apolipoprotein E ϵ 4 and Cerebral Hemorrhage Associated with Amyloid Angiopathy. *Ann. Neurol.* **1995**, *38*, 254–259. [[CrossRef](#)]
21. Marais, A.D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* **2019**, *51*, 165–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Olichney, J.M.; Hansen, L.A.; Galasko, D.; Saitoh, T.; Hofstetter, C.R.; Katzman, R.; Thal, L.J. The apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with increased neuritic plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer’s disease and Lewy body variant. *Neurology* **1996**, *47*, 190–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nicoll, J.A.; McCarron, M.O. APOE gene polymorphism as a risk factor for cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *Amyloid* **2001**, *8* (Suppl. 1), 51–55.
24. Liu, Y.; Wang, H.; Han, P.-R.; Tan, C.; Wang, C.; Meng, X.-F.; Risacher, S.L.; Saykin, A.J. APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer’s disease: Systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2015**, *86*, 127–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Risch, N.J.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.C.; Rimmler, J.B.; Locke, P.A.; Conneally, P.M.; Schmechel, K.E.; et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* **1994**, *7*, 180–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Greenberg, S.M.; Vonsattel, J.-P.G.; Segal, A.Z.; Chiu, R.I.; Clatworthy, A.E.; Liao, A.; Hyman, B.T.; Rebeck, G.W. Association of apolipoprotein E and ϵ 2 vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* **1998**, *50*, 638–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Deane, R.; Sagare, A.; Hamm, K.; Parisi, M.; Lane, S.; Finn, M.B.; Holtzman, D.M.; Zlokovic, B.V. ApoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 4002–4013. [[CrossRef](#)]
28. Foster, E.M.; Dangla-Valls, A.; Lovestone, S.; Ribe, E.M.; Buckley, N.J. Clusterin in Alzheimer’s disease: Mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–27. [[CrossRef](#)]
29. Sun, Y.; Shi, J.; Zhang, S.; Tang, M.; Han, H.; Guo, Y.; Ma, C.; Liu, X.; Li, T. The APOC3 SstI polymorphism is weakly associated with sporadic Alzheimer’s disease in a Chinese population. *Neurosci. Lett.* **2005**, *380*, 219–222. [[CrossRef](#)]
30. Vollbach, H.; Heun, R.; Morris, C.M.; Edwardson, J.A.; McKeith, I.G.; Jessen, F.; Schulz, A.; Maier, W.; Kölsch, H. APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann. Neurol.* **2005**, *58*, 436–441. [[CrossRef](#)]
31. Hoofnagle, A.N.; Heinecke, J.W. Lipoproteomics: Using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1967–1975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Alaupovic, P. Apolipoprotein composition as the basis for classifying plasma lipoproteins. Characterization of ApoA- and ApoB-containing lipoprotein families. *Prog. Lipid Res.* **1991**, *30*, 105–138. [[CrossRef](#)]

33. Kontush, A.; Chapman, M.J. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: Focus on antioxidative activities. *Curr. Opin. Lipidol.* **2010**, *21*, 312–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Stukas, S.; Robert, J.; Wellington, C.L. High-density lipoproteins and cerebrovascular integrity in Alzheimer's disease. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 574–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Huynh, T.P.V.; Davis, A.A.; Ulrich, J.D.; Holtzman, D.M. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: The influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 824–836. [[CrossRef](#)]
36. Narayan, P.; Orte, A.; Clarke, R.W.; Bolognesi, B.; Ganzinger, K.A.; Meehan, S.; Wilson, M.R.; Christopher, M. The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the A β 1–40 peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *19*, 79–83. [[CrossRef](#)]
37. Bell, R.D.; Sagare, A.; Friedman, A.E.; Bedi, G.; Holtzman, D.M.; Deane, R.; Zlokovic, B.V. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid β -peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, *27*, 909–918. [[CrossRef](#)]
38. Merino-Zamorano, C.; De Retana, S.F.; Montañola, A.; Battle, A.; Saint-Pol, J.; Mysiorek, C.; Gosselet, F.; Montaner, J.; Hernández-Guillamon, M. Modulation of Amyloid- β 1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *J. Alzheimer's Dis.* **2016**. [[CrossRef](#)]
39. Hottman, D.A.; Chernick, D.; Cheng, S.; Wang, Z.; Li, L. HDL and Cognition in Neurodegenerative Disorders. *Neurobiol Dis.* **2014**, *72PA*, 22–36. [[CrossRef](#)]
40. Linn, J.; Halpin, A.; Demareel, P.; Ruhland, J.; Giese, A.; Dichgans, M.; van Buchem, M.B.H. Prevalence of Superficial Siderosis in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neurology* **2010**, *74*, 1346–1350. [[CrossRef](#)]
41. McKhann, G.; Knopman, D.S.; Chertkow, H.; Hyman, B.T.; Jack, C.R., Jr.; Kawas, C.H.; Klunk, W.E.; Koroshetz, W.J.; Manly, J.J.; Mayeux, R.; et al. the diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2011**, *7*, 263–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Folstein, M.F.; Folstein, S.E.; McHugh, P.R. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* **1975**, *12*, 189–198. [[CrossRef](#)]
43. NCEP. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **2002**, *106*, 3143–3421. [[CrossRef](#)]
44. Sánchez-Quesada, J.L.; Benítez, S.; Otal, C.; Franco, M.; Blanco-Vaca, F.; Ordóñez-Llanos, J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 699–705. [[CrossRef](#)]
45. Benítez, S.; Sánchez-Quesada, J.L.; Ribas, V.; Jorba, O.; Blanco-Vaca, F.; González-Sastre, F.; Ordóñez-Llanos, J. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* **2003**, *108*, 92–96. [[CrossRef](#)]
46. Sánchez-Quesada, J.L.; Vinagre, I.; De Juan-Franco, E.; Sánchez-Hernández, J.; Bonet-Marques, R.; Blanco-Vaca, F.; Ordóñez-Llanos, J.; Pérez, A. Impact of the LDL subfraction phenotype on Lp-PLA2 distribution, LDL modification and HDL composition in type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* **2013**, *12*, 1–8. [[CrossRef](#)]
47. Benítez, S.; Sánchez-Quesada, J.L.; Lucero, L.; Arcelus, R.; Ribas, V.; Jorba, O.; Castellví, A.; Alonso, E.; Blanco-Vaca, F.; Ordóñez-Llanos, J. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis* **2002**, *160*, 223–232. [[CrossRef](#)]
48. De Juan-Franco, E.; Pérez, A.; Ribas, V.; Sánchez-Hernández, J.A.; Blanco-Vaca, F.; Ordóñez-Llanos, J.; Sánchez-Quesada, J.L. Standardization of a method to evaluate the antioxidant capacity of high-density lipoproteins. *Int. J. Biomed. Sci.* **2009**, *5*, 402–410.
49. Phuah, C.L.; Raffeld, M.R.; Ayres, A.M.; Viswanathan, A.; Greenberg, S.M.; Biffi, A.; Rosand, J.; Anderson, C.D. Subacute decline in serum lipids precedes the occurrence of primary intracerebral hemorrhage. *Neurology* **2016**, *86*, 2034–2041. [[CrossRef](#)]
50. Kulminski, A.M.; Raghavachari, N.; Arbee, K.G.; Culminskaya, I.; Arbee, L.; Wu, D.; Ukraintseva, S.V.; Christensen, K.; Yashin, A.I. Protective role of the apolipoprotein E2 allele in age-related disease traits and survival: Evidence from the Long Life Family Study. *Biogerontology* **2016**, *17*, 893–905. [[CrossRef](#)]
51. Rodríguez-Luna, D.; Rubiera, M.; Ribo, M.; Coscojuela, P.; Pagola, J.; Piñeiro, S.; Ibarra, B.; Meler, P.; Maisterra, O.; Romero, F.; et al. Serum low-density lipoprotein cholesterol level predicts hematoma growth and clinical outcome after acute intracerebral hemorrhage. *Stroke* **2011**, *42*, 2447–2452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Romero, J.R.; Preis, S.R.; Beiser, A.; Decarli, C.; Viswanathan, A.; Martinez-Ramirez, S.; Kase, C.S.; Wolf, P.A.; Seshadri, S. Risk factors, stroke prevention treatments, and prevalence of cerebral microbleeds in the framingham heart study. *Stroke* **2014**, *45*, 1492–1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ding, J.; Sigurdsson, S.; Garcia, M.; Phillips, C.L.; Eirikdottir, G.; Gudnason, V.; van Buchem, M.A.; Launer, L.J. Risk Factors Associated With Incident Cerebral Microbleeds According to Location in Older People: The Age, Gene/Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik Study. *JAMA Neurol.* **2015**, *72*, 682–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Charidimou, A.; Martinez-Ramirez, S.; Reijmer, Y.D.; Oliveira-filho, J.; Lauer, A.; Roongpiboonsopit, D.; Frosch, M.; Vashkevich, A.; Ayres, A.; Rosand, J.; et al. Total MRI small vessel disease burden in cerebral amyloid angiopathy: A concept validation imaging-pathological study. *JAMA Neurol.* **2017**, *73*, 994–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Konishi, M.; Iso, H.; Komachi, Y.; Lida, M.; Shimamoto, T.; Jacobs, D.R.; Terao, A.; Baba, S.; Sankai, T.; Ito, M. Associations of serum total cholesterol, different types of stroke, and stenosis distribution of cerebral arteries: The akita pathology study. *Stroke* **1993**, *24*, 954–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Lei, C.; Wu, B.; Liu, M.; Chen, Y. Association between statin use and intracerebral hemorrhage: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Neurol.* **2014**, *21*, 192–198. [[CrossRef](#)]
57. Song, H.B.; Jun, H.O.; Kim, J.H.; Yu, Y.S.; Kim, K.W.; Min, B.H.; Kim, J.H. Anti-apoptotic effect of clusterin on cisplatin-induced cell death of retinoblastoma cells. *Oncol. Rep.* **2013**, *30*, 2713–2718. [[CrossRef](#)]
58. Lehallier, B.; Essioux, L.; Gayan, J.; Alexandridis, R.; Nikolcheva, T.; Wyss-Coray, T.; Britschgi, M. Combined Plasma and Cerebrospinal Fluid Signature for the Prediction of Midterm Progression From Mild Cognitive Impairment to Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* **2016**, *73*, 203–212. [[CrossRef](#)]
59. Jin, J.L.; Guo, Y.L.; Li, J.J. Apoprotein C-III: A review of its clinical implications. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *460*, 50–54. [[CrossRef](#)]
60. Jensen, M.K.; Aroner, A.A.; Mukamal, K.J.; Furtado, J.D.; Post, W.S.; Tsai, M.Y.; Tjønneland, A.; Polak, J.F.; Rimm, E.B.; Overvad, K.; et al. HDL subspecies defined by presence of apolipoprotein C-III and incident coronary heart disease in four cohorts. *Circulation* **2018**, *137*, 1364–1373. [[CrossRef](#)]
61. Morton, A.M.; Koch, M.; Mendivil, C.O.; Furtado, J.D.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Wang, L.; Jensen, M.K.; Sacks, F.M. Apolipoproteins E and CIII interact to regulate HDL metabolism and coronary heart disease risk. *JCI insight* **2018**, *3*, 1–20. [[CrossRef](#)]
62. Morton, A.M.; Furtado, J.D.; Mendivil, C.O.; Sacks, F.M. Dietary unsaturated fat increases HDL metabolic pathways involving apoE favorable to reverse cholesterol transport. *JCI Insight* **2019**, *4*, 1–14. [[CrossRef](#)]
63. Robert, J.; Button, E.B.; Martin, E.M.; McAlary, L.; Gidden, Z.; Gilmour, M.; Boyce, G.; Caffrey, T.M.; Agbay, A.; Clark, A.; et al. Cerebrovascular amyloid angiopathy in bioengineered vessels is reduced by high-density lipoprotein particles enriched in Apolipoprotein E. *Mol. Neurodegener.* **2020**, *15*, 1–21. [[CrossRef](#)]
64. Koch, M.; DeKosky, S.T.; Goodman, M.; Sun, J.; Furtado, J.D.; Fitzpatrick, A.; Mackey, R.H.; Cai, T.; Lopez, O.L.; Kuller, L.H.; et al. High-density lipoprotein and its apolipoprotein-defined subspecies and risk of dementia. *J. Lipid Res.* **2020**, *61*, 445–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kinney, J.W.; Bemiller, S.M.; Murtishaw, A.S.; Leisgang, A.M.; Salazar, A.M.; Lamb, B.T. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2018**, *4*, 575–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wojtas, A.M.; Kang, S.S.; Olley, B.M.; Gatherer, M.; Shinohara, M.; Lozano, P.A.; Liu, C.-C.; Kurti, A.; Baker, K.E.; Dickson, D.W.; et al. Loss of clusterin shifts amyloid deposition to the cerebrovasculature via disruption of perivascular drainage pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E6962–E6971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Miners, J.S.; Clarke, P.; Love, S. Clusterin levels are increased in Alzheimer’s disease and influence the regional distribution of A β . *Brain Pathol.* **2017**, *27*, 305–313. [[CrossRef](#)]
68. Hondius, D.C.; Eigenhuis, K.N.; Morrema, T.H.J.; van der Schors, R.C.; van Nierop, P.; Bugiani, M.; Li, K.W.; Hoozemans, J.J.M.; Smit, A.B.; Rozemuller, A.J.M. Proteomics analysis identifies new markers associated with capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2018**, *6*, 46. [[CrossRef](#)]
69. Camacho, J.; Moliné, T.; Bonaterra-Pastra, A.; Cajal, S.R.Y.; Martínez-Sáez, E.; Hernández-Guillamon, M. Brain ApoA-I, ApoJ and ApoE immunodetection in cerebral amyloid angiopathy. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 187. [[CrossRef](#)]
70. Manousopoulou, A.; Gatherer, M.; Smith, C.; Nicoll, J.A.R.; Woelk, C.H.; Johnson, M.; Kalaria, R.; Attems, J.; Garbis, S.D.; Carare, R.O. Systems proteomic analysis reveals that clusterin and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 increase in leptomeningeal arteries affected by cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2017**, *43*, 492–504. [[CrossRef](#)]
71. Schrijvers, E.M.C.; Koudstaal, P.J.; Hofman, A.; Breteler, M.M.B. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA* **2011**, *305*, 1322–1326. [[CrossRef](#)]
72. Montañola, A.; de Retana, S.F.; López-Rueda, A.; Merino-Zamorano, C.; Penalba, A.; Fernández-Álvarez, P.; Rodríguez-Luna, D.; Malagelada, A.; Pujadas, F.; Montaner, J.; et al. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromol. Med.* **2016**, *18*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Gupta, V.B.; Doecke, J.D.; Hone, E.; Pedrini, S.; Laws, S.M.; Thambisetty, M.; Bush, A.I.; Rowe, C.C.; Villemagne, V.L.; Ames, D.; et al. Plasma apolipoprotein J as a potential biomarker for Alzheimer’s disease: Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle study of aging. *Alzheimer’s Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* **2016**, *3*, 18–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Delabar, J.M.; Ortner, M.; Simon, S.; Wijkhuisen, A.; Feraudet-Tarisse, C.; Pegon, J.; Vidal, E.; Hirschberg, Y.; Dubois, B.; Potier, M. Altered age-linked regulation of plasma DYRK1A in elderly cognitive complainers (INSIGHT-preAD study) with high brain amyloid load. *Alzheimer’s Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2020**, *6*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Weinstein, G.; Beiser, A.S.; Preis, S.R.; Courchesne, P.; Chouraki, V.; Levy, D.; Seshadri, S. Plasma clusterin levels and risk of dementia, Alzheimer’s disease, and stroke. *Alzheimer’s Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* **2016**, *3*, 103–109. [[CrossRef](#)]
76. Matsubara, E.; Frangione, B.; Ghiso, J. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer’s A β interaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7563–7567. [[CrossRef](#)]
77. Yerbury, J.J.; Poon, S.; Meehan, S.; Thompson, B.; Kumita, J.R.; Dobson, C.M.; Wilson, M.R. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J.* **2007**, *21*, 2312–2322. [[CrossRef](#)]
78. Calero, M.; Tokuda, T.; Rostagno, A.; Kumar, A.; Zlokovic, B.; Frangione, B.; Ghiso, J. Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin). *Biochem. J.* **1999**, *344*, 375–383. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials

Table S1. Binary logistic regression for lipid profile and apolipoprotein concentration in plasma.

Parameters	Ctrl – ICH-CAA		Ctrl – AD		ICH-CAA – AD	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value
Chol LDL	-	-	-	-	1.016 (1.005–1.027)	0.004
ApoA-II	0.538 (0.346–0.835)	0.006	-	-	-	-
ApoE4	-	-	-	-	2.801 (1.171–6.704)	0.021

Table S2. Binary logistic regression for VLDL composition.

Parameters	Ctrl – ICH-CAA		Ctrl – AD		ICH-CAA – AD	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value
Esterified chol	0.808 (0.683–0.956)	0.013	-	-	-	-
ApoC-III	-	-	-	-	0.39 (0.184–0.829)	0.014
ApoE4	-	-	-	-	2.8 (1.184–6.625)	0.019

Table S3. Binary logistic regression for HDL composition.

Parameters	Ctrl – ICH-CAA		Ctrl – AD		ICH-CAA – AD	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value
Esterified chol	1.583 (1.119–2.239)	0.010	-	-	0.525(0.365–0.754)	0.0005
ApoC-III	0.414(0.221–0.772)	0.006	-	-	-	-
ApoE4	-	-	-	-	4.529 (1.771–11.579)	0.002

Table S4. Binary logistic regression for ApoJ content in lipoproteins.

Parameters	Ctrl – ICH-CAA		Ctrl – AD		ICH-CAA – AD	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value
ApoJ LDL	-	-	-	-	1.015 (1.002–1.027)	0.019
ApoE4	-	-	-	-	11.092 (1.796–68.5)	0.010

Table S5. Binary logistic regression for lipoprotein size.

Parameters	Ctrl – ICH-CAA		Ctrl – AD		ICH-CAA – AD	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value
LDL size	-	-	-	-	0.55 (0.331–0.912)	0.021
Lp-PLA ₂ activity in HDL (%)	-	-	-	-	0.962 (0.925–1)	0.049
ApoE4	-	-	-	-	3.006 (1.245–7.26)	0.014

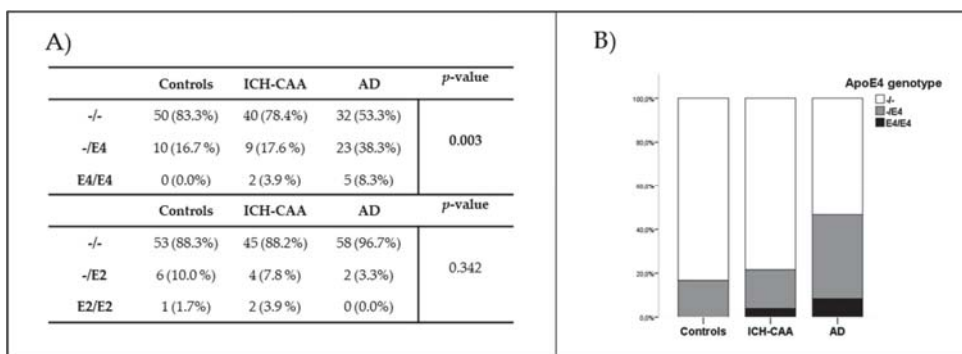


Figure S1. ApoE genotype. (A) Contingency table of ApoE genotype according to clinical diagnosis. (B) ApoE4 genotype frequency (%) according to clinical diagnosis.

3. The presence of circulating human Apolipoprotein J reduces the number of cerebral microbleeds associated with cerebral amyloid angiopathy in mice

The presence of circulating human Apolipoprotein J reduces the number of cerebral microbleeds associated with cerebral amyloid angiopathy in mice

Anna Bonaterra-Pastra, MS.¹, Montse Solé, PhD¹, Silvia Lope-Piedrafita, PhD² Maria Lucas, MS¹, Paula Marazuela, PhD¹, Olalla Pancorbo, MS.³, David Rodríguez-Luna, MD, PhD³ and Mar Hernández-Guillamon, PhD^{1*}

1. Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

2. Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

3. Stroke Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain.

* Correspondence: Mar.hernandez.guillamon@vhir.org. Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron, 119-129, Ed. Mediterrània, 1st floor, lab 106, 08035, Barcelona, Spain

Short title: Levels of rApoJ and microbleed count in APP23 mice

Abstract

Background: Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is characterized by progressive deposition of amyloid β ($A\beta$) in cerebral blood vessels that can cause lobar symptomatic intracerebral hemorrhages (ICH) and lobar microbleeds (CMB). Apolipoprotein J (ApoJ) is a multifunctional chaperone related to $A\beta$ aggregation and clearance. The present study aimed to determine the effect of rhApoJ chronic treatment in a transgenic mouse model of CAA, in terms of vascular damage evaluated by the presence of spontaneous CMBs.

Methods: Twenty-month-old APP23 C57BL/6 mice received a treatment of 25 doses of rhApoJ (1mg/kg) (n=9) or saline (n=8) intraperitoneally during 13 weeks, while wild-type mice received saline (n=13). Brains from postmortem mice were subjected to T2*-weighted magnetic resonance imaging (MRI) to detect hemorrhagic lesions as hypointensities. To determine the potential clinical relevance of some of the findings in humans, acute plasma samples from 40 patients with ICH and 17 controls were analyzed.

Results: APP23 mice that chronically received rhApoJ presented a lower number of cortical CMBs ($p=0.012$) and larger hemorrhages ($p=0.002$) than saline-treated mice, independently of the total and vascular $A\beta$ levels in the brain. After the rhApoJ treatment in mice, the human protein was detected in plasma and in occasional leptomeningeal vessels, but not in the parenchyma, suggesting that its effect was mediated through the periphery. The administration of rhApoJ induced a significant increase of Gro- α ($p=0.035$) and MIP-1 α ($p=0.035$) plasma levels and a reduction of circulating MMP-12 ($p=0.046$) levels compared to the saline-treated group. In plasma samples from patients presenting a lobar ICH, MMP-12 levels were significantly associated with a larger hemorrhage volume ($p=0.040$) and more irregular ICH shape ($p=0.036$).

Conclusions: Chronic treatment with rhApoJ in aged APP233 mice ameliorated the neurovascular damage associated with CAA pathology by decreasing the occurrence of cortical microbleeds. We propose that rhApoJ treatment could prevent BBB leakage and the appearance of CMB associated with CAA partly through the modulation of circulating MMP-12.

Background

Cerebral amyloid Angiopathy (CAA) is caused by the cerebrovascular accumulation of amyloid, commonly amyloid- β ($A\beta$). $A\beta$ is the result of the sequential processing of amyloid precursor protein (APP) that can result in peptides of different sizes that tend to aggregate, with the most common forms being $A\beta_{40}$, which mainly deposits in brain blood vessels causing CAA, and $A\beta_{42}$ that tends to deposit in the parenchyma being a hallmark of Alzheimer's Disease (AD)¹. Currently, there is no treatment for CAA, which is the main cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) in adults >55 years². The $A\beta$ accumulation in brain blood vessels causes smooth muscle cell loss and vascular dysfunction which could contribute to the appearance of cerebral microbleeds (CMB) in a specific lobar location³. Indeed, the presence of lobar CMBs is one of the main radiological and pathological features of CAA⁴ and is associated with the progression of CAA and the recurring risk of ICH^{5,6}. In addition, CMBs are associated with a higher likelihood of dementia⁷, and severity of cognitive dysfunction^{8,9}. Therefore, the progression of new CMB could be considered a clinical endpoint to monitor future treatments for CAA.

Apolipoprotein J (ApoJ), also known as Clusterin (Clu), is a multifunctional chaperone that co-deposits with cerebrovascular $A\beta$ in human brains^{10–12} and can prevent $A\beta$ fibrillogenesis^{13,14} and toxicity *in vitro*¹⁵. In this sense, we have previously reported that the peripheral treatment with recombinant human ApoJ (rhApoJ) reduced vascular $A\beta$ deposits in APP23 mice¹⁶, an *in vivo* model of cerebral β -amyloidosis that presents parenchymal $A\beta$ accumulation and prominent $A\beta_{40}$ deposition in brain vessels, as well as vascular dysfunction and CMBs^{17–20}. Nevertheless, the potential impact of ApoJ regarding functional endpoints related to CAA pathology, such as cerebral hemorrhage occurrence, still needs to be investigated. With this background, the aim of this study was to evaluate the effect of increasing the plasma ApoJ levels in aged APP23 mice.

Methodology

Human recombinant ApoJ production and purification

We have previously reported the production of human recombinant ApoJ (rhApoJ)^{16,21,22}. Briefly, transfected human embryonic kidney 293 T cells (HEK293T) that overexpress human ApoJ were cultured in HYPERFlask systems (Corning Inc., Corning, NY, USA). Supernatants were used for protein purification with fast protein liquid chromatography

(FLPC; AKTA Purifier 100 system, GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA) by Ni-affinity with HiScreen Ni FF columns (GE Healthcare) in the ICTS “NANOBIOSIS”, Protein Production Platform Unit of the CIBER-BBN at the Universitat Autònoma de Barcelona, obtaining a purity >75%²². The purified protein was dialyzed overnight (ON) against PBS in 10 KDa SnakeSkin Dialysis Tubing membranes at 4 °C (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Protein concentration was quantified by bicinchoninic acid assay (BCA) (Thermo Fisher) and diluted to a final concentration of 300 µg of rhApoJ per PBS mL. Aliquots were stored at -80 °C until their usage.

In vivo administration of rhApoJ

APP23 mice (B6.Cg-Tg (Thy1-APP) 3Somm/J) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and WT mice were C57BL/6 mice obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Male APP23 mice were backcrossed with WT females, and the genotype was tested by Transnetyx (Cordova, TN, USA). The mice used were aged in the animal facility of our institution and housed in a climate-controlled environment on a 12/12 hours light/dark cycle with food and water *ad libitum*. For the experiments, we treated two groups. Group 1 consisted of APP23 females of 20±0.5 months old at the beginning of the experiment that received a chronic treatment of 25 doses of rhApoJ (1mg/kg) (n=9) or saline (n=8) intraperitoneally (IP) for 13 weeks, whereas old-matched wild-type (WT) female mice received saline solution (n=13). Mice were euthanized 3 days after the last administration, after ON fasting (Supplemental Figure 1.A). Group 2 was composed of 19.6±2.3 months old APP23 female mice that received one intraperitoneal dose of rhApoJ (1mg/kg) (n=4), saline (n=3), and old-matched WT female mice that received saline (n=3). Mice from group 2 were euthanized 30 minutes after the administration (Supplemental Figure 1.B). Administrations and analyses of mice samples were performed in a blinded manner. Five animals died during treatments, but neither mortality nor body weight loss was associated with the treatment. All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Vall d'Hebron Research Institute and Universitat Autònoma de Barcelona (CEA-OH/10888/1) and conducted in compliance with Spanish legislation (RD 53/2013) and European Union Directives (86/609/EEC). The treatment was conducted from February to April 2020.

Mice cerebrospinal fluid (CSF), brain and blood collection

At the moment of euthanasia, mice were anesthetized with isoflurane inhalation and CSF was sampled as previously described¹⁶. Briefly, CSF was collected by penetrating glass capillaries (0.5 mm in diameter) in the dura mater of the cistern Magna under the microscope. Only completely clear CSF was considered for further experiments. After CSF extraction, blood was sampled via intracardiac puncture. Blood samples were centrifuged in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-tubes to recollect EDTA plasma. For group 1, mice were perfused with 20 mL of cold saline followed by 20 mL of paraformaldehyde (PFA) 4%. Brains were rapidly removed and stored in PFA 4% at 4 °C for 72 hours, and then transferred to PBS with 0.01% Sodium Azide for a minimum of 10 days for tissue stabilization. Mice from group 2 were perfused with 20 mL of cold saline after CSF and blood extraction. Brains were rapidly removed and the left hemisphere was immediately immersed in 10% formalin for 72 hours before paraffin embedding, whereas the right hemisphere was snap-frozen in liquid nitrogen.

Mice ex-vivo brain MRI

Mice from group 1 were subjected to ex-vivo T2*-weighted magnetic resonance imaging (MRI) in a horizontal magnetic system (7T, BioSpec 70/30USR, Bruker, Ettlingen, Germany) immersed in Galden® D05 PFPE (Solvay, Bollate, Italy). MRIs were performed at Servei de Resonància Magnètica Nuclear at Universitat Autònoma de Barcelona with the operational software Paravision (Bruker). The imaging parameters used were: repetition time 700 ms, echo time 8 ms, matrix 160 x 160, field-of-view 1.28 x 1.28 cm², slice thickness 0.3 mm, and the number of slices 28. The total acquisition time for a voxel of a size of 0.08x0.08x0.3 mm³ was 22 minutes. Spheric hypointense signals on T2* were visually counted as hemorrhagic lesions and classified as CMB (50-300 µm diameter) or larger hemorrhages (>300 µm)²⁰. To avoid counting the same hemorrhagic lesion multiple times, its presence was carefully controlled over several consecutive slices. Hemorrhagic lesions were also classified according to their location as lobar (cortex) or deep (thalamus and basal ganglia). The volume of hemorrhagic lesions was quantified using Image J Software (NIH, Maryland, MD, USA). An example of 24 T2*-MRI brain sections from one saline-treated APP23 mouse is shown in Supplemental Figure 2. After the MRI acquisitions, brains were immersed in 10% formalin for 12 hours and paraffin-embedded.

Brain homogenates

The right brain hemispheres of group 2 were homogenized in cold sucrose buffer (0.32 M of sucrose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 5 mM Hepes (Thermo Fisher)) with a Dounce homogenizer. The double amount of RIPA lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors was added to the homogenates and then centrifuged for 15 minutes at 15000 g at 4°C to obtain the final supernatant as the final brain homogenate.

Brain sections stainings

Sagittal paraffin-embedded sections were used for several staining processes, including Thioflavin S (Ths) to stain fibrillary A β , Resorufin for the specific detection of vascular A β ²³, and incubations with different antibodies to perform immunohistochemistry or immunofluorescence techniques. Details of each staining method are detailed in Supplementary Methods. Images from all histological sections were obtained with the Panoramic 250 scanner (3DHistech, Budapest, Hungary). A 20x objective was used to digitize the slides and images were captured and processed using Case Viewer Software (3DHistech). Quantifications were performed with ImageJ software (NIH) and are detailed in Supplementary Methods.

Human study population

The study cohort consisted in 40 participants who suffered at least one ICH, 18 of them in deep brain areas, and 22 in a lobar location. All patients underwent a computerized tomography (CT) scan to detect the ICH which is observed as a hyperintense signal²⁴. ICH volume was measured in the CT scan using semiautomatic Hounsfield-unit, threshold-based, computerized planimetry software. Also, the shape of the hemorrhage was analyzed according to Barras et al²⁵ on a 1-5 scale, with 1 being the most regular shape and 5 the most irregular. Demographic characteristics, vascular risk factors, medication and ApoE genotype were also annotated. Blood from ICH patients was collected in the acute phase (<24 hours from CT) in EDTA-containing Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and centrifuged at 4 °C for 15 min at 2500 rpm. Clinical parameters in plasma were evaluated by Vall d'Hebron University Hospital laboratories. The rest of the plasma obtained from each patient was aliquoted and frozen at -80°C. The study also contemplated the analysis of samples from control participants (n=17) with no stroke history from the PARIAS study (Patients At Risk of Ischemic Acute Stroke). The study was approved by the local Clinical Investigation Ethical Committee

(PR(AG)269/2017, 2014PI/162-1) and conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Single and Multiplexed ELISAs

A β ₄₀ quantification in mice CSF was performed by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (#KHB3481, Invitrogen, Waltham, MA, USA) following manufacturer instructions. Plasma and brain levels of hApoJ were analyzed with a commercial kit specific for human ApoJ (#3713-1HP-1, Mabtech, Stockholm, Sweden). Plasma inflammation markers (Gro α , Il-1 β , IL-17A, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 α) and matrix metalloproteinase (MMP) (MMP-2, MMP-3, MMP-8, proMMP-9, MMP-12) levels were evaluated by multiplexed ELISAs (#EPX080-20832-901, Thermo Fisher; #MMMP1MAG-79K and # MMMP2MAG-79K, Merck, Darmstadt, Germany). MMP-12 levels in human plasma were evaluated by ELISA kit (#EH327RB, Thermo Fisher).

Statistical Analysis

The distribution among linear variables was tested using the Shapiro-Wilk test. If the distribution was normal, analysis were performed with a t-test or a one-way ANOVA test with Bonferroni corrections. If not normal, a Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test with a Dunn's post hoc for multiple comparisons was performed. When studying the association between categorical variables, crosstab and Chi-squared or Fisher tests were used accordingly. For correlations, associations between variables were analyzed with Pearson or Spearman correlation coefficients (R and Rho), according to the normality of each variable. Backward linear regressions were performed and the slope (B) with a 95% confidence interval (CI) was estimated in each case. Normal variables are expressed as mean \pm SD, whereas non-normal variables are expressed as median [Interquartile Range]. A p-value below 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using SPSS Statistics version 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and Graphpad Prism 9 (Prism, Pleasant Hill, CA, USA). Extreme outlier values detected by the SPSS software were discarded from the analysis.

Results

We observed that 23 months old APP23 presented a higher number of cerebral hemorrhages than WT mice (9.6 \pm 5.25 vs. 1.3 \pm 1.49, respectively; p<0.001) detected by ex-vivo T2*-MRI, in accordance with previous results¹⁷. More interestingly, chronic

rhApoJ treatment significantly reduced the total number of cerebral hemorrhagic lesions compared to saline-treated APP23 mice (6.43 ± 4.96 vs 13.38 ± 3.89 respectively; $p=0.011$) (Figure 1.A). Whereas in the cortex rhApoJ treatment significantly reduced the total number of cerebral hemorrhages (saline-treated: 6.88 ± 2.95 vs rhApoJ-treated: 2.43 ± 1.15 ; $p=0.002$), including CMBs (saline-treated: 5.13 ± 2.30 vs rhApoJ-treated: 2.14 ± 1.86 ; $p=0.012$) and larger hemorrhages (saline-treated: 1.75 ± 1.04 vs rhApoJ-treated: 0.29 ± 0.49 ; $p=0.001$) compared with saline-treated mouse brains (Figure 1.B), no differences were observed in the count of hemorrhagic lesions in deep brain areas (Figure 1.C). Although mice that chronically received the rhApoJ treatment presented lower number of hemorrhagic lesions, their mean volume was similar among groups (saline-treated: 0.041 ± 0.023 mm³ vs. rhApoJ-treated: 0.030 ± 0.014 mm³; $p=0.695$) in both cortex and deep brain areas.

Because the APP23 transgenic mouse line can be considered a model of CAA for the prominent cerebrovascular A β ₄₀ accumulation, we evaluated if the reduction of cerebral hemorrhagic lesions was related to cerebral A β levels. We observed that the amount of A β deposited in the brain was similar among chronically treated APP23 mice. More in detail, no significant differences were observed in the total number of deposits per area, the positive percentage and the average size of the deposits, neither with ThS staining nor with A β ₄₀ IHC (Figure 2.A, Supplemental table 1). Vascular A β levels were quantified as the number of positive vessels using ThS, Resorufine stainings and A β ₄₀ IHC (Supplemental table 2), but no differences were detected among treatment groups either (Figure 2.A). A β ₄₀ levels in CSF, obtained 3 days after the last administration with rhApoJ or saline, were also similar among treatment groups. As expected, aged-matched WT mice did not present circulating A β levels or brain A β deposits. Although no differences in the A β load were found between APP23 groups, rhApoJ-treated mice showed a significant inverse correlation between the number of fibrillary A β deposits per area in the cortex (ThS-positive brain deposits) with the number of A β -positive cortical vessels (resorufin-positive vessels) ($R=-0.824$, $p=0.023$), which was not observed in the saline-treated mouse brains. Remarkably, only the chronically rhApoJ-treated mice presented a significant association between the number of A β -positive cortical vessels and the number of cortical hemorrhagic lesions ($p=0.029$, $Rho=0.805$) and specifically large cortical hemorrhages ($Rho=0.791$, $p=0.034$).

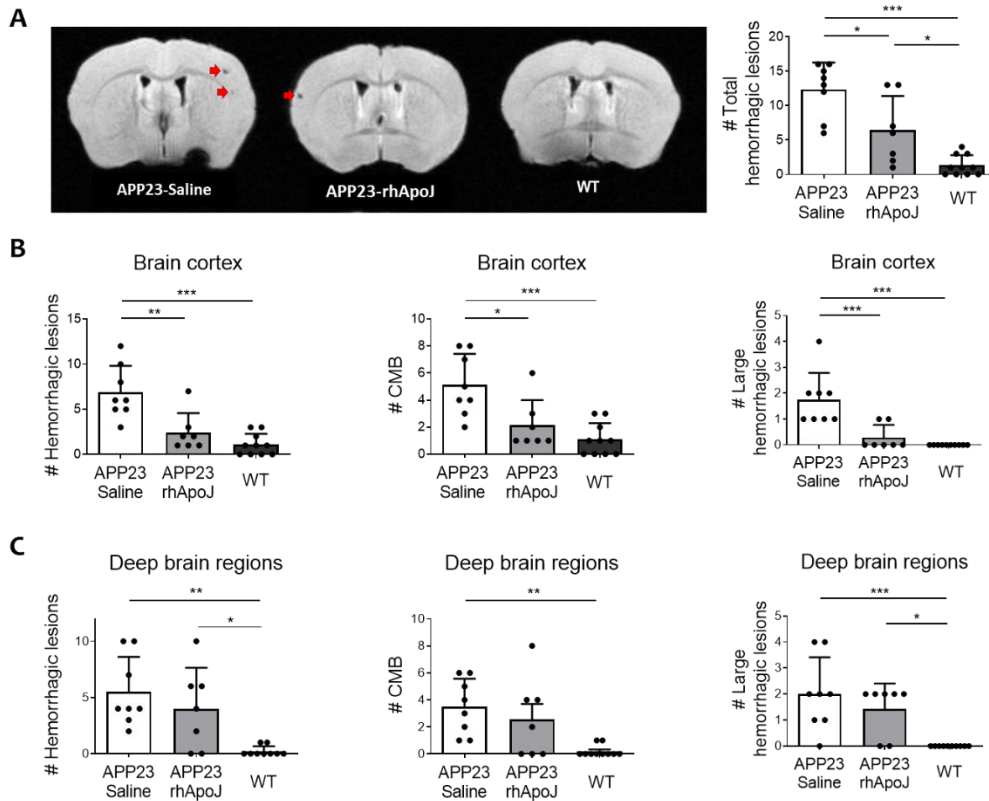


Figure 1. A) Representative T2*-weighted cerebral MRI sections of APP23 mice chronically treated with saline or rhApoJ, and WT mice treated with saline. CMB are indicated with red arrows. Graphical representation of the total number of hemorrhagic lesions. B) Graphical representation of the number of hemorrhagic lesions, CMB (50-300 μm diameter) and large hemorrhagic lesions (>300 μm) in the brain cortex, and C) in deep brain regions (thalamus and basal ganglia). Data are represented as mean+SD. #: count. *:p<0.05 **:p<0.01 ***:p<0.001.

Active microglia is associated with higher pathology severity in human CAA brains, suggesting a relation between perivascular inflammation and BBB leakage²⁶. To determine whether the microglial state could be influenced by the rhApoJ treatment and impacted the occurrence of CMB, we analyzed the levels of CD68 (as a marker of phagocytic microglia) and Iba1 (as a marker of resident microglia) in brains from chronically treated mice (group 1). We observed that the cortex from APP23 mice presented significantly higher levels of CD68 than WT brains (WT: 45.64 [24.67 – 47-21] counts/area, saline-treated APP23: 82.16 [49.29 – 262.73] counts/area, p=0.035; rhApoJ-treated APP23 115.50 [87.75 – 129.76] counts/area, p=0.023), as also occurred for Iba1 (WT: 19.45±16.68, saline-treated APP23: 104.90±36.70 counts/area, p=0.005;

rhApoJ-treated APP23 98.81 ± 40.74 counts/area, $p=0.008$). However, no significant differences were observed between rhApoJ-treated and saline-treated APP23 mice (Figure 2.B).

ApoJ is a short-life protein with a half-life of 2 hours in carcinogenic human cells²⁷. Because mice from group 1 were euthanized 3 days after the last dose of the treatment to avoid the acute reaction induced by the administration of a recombinant protein, certain molecular mechanisms associated with the direct action of rhApoJ could be masked due to the experimental design. To overcome this, a second group of mice (group 2) was treated and euthanized right after the administration (30 minutes time gap) (Supplemental Figure 1). Unlike what was observed in group 1, in the second group, we were able to verify the presence of the human rhApoJ in plasma, as well as in some occasional leptomenigeal vessels in the brain (Figure 3.A), as we previously reported when administered the recombinant protein intravenously¹⁶. In all cases, we did not detect the rhApoJ inside the brain after an acute or chronic IP administration. We next evaluated the effect of the peripheral treatment regarding potential changes in inflammatory markers and MMPs, which could be related to the CMB occurrence in this CAA mouse model. In this sense, rhApoJ-treated mice from group 2 presented significantly higher plasma levels of chemokines Gro α (saline-treated: $12.14 [11.78 - 16.56]$ pg/mL vs. rhApoJ-treated: $34.73 [28.33 - 51.82]$ pg/mL, $p=0.035$) and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α (saline-treated: $0.08 [0.08 - 0.08]$ pg/mL vs. rhApoJ-treated: $0.38 [0.30 - 0.86]$ pg/mL, $p=0.035$) compared with saline-treated APP23 (Figure 3.B, Supplemental table 3). Regarding the levels of plasma MMPs, we found that rhApoJ-treated mice showed significantly lower levels of circulating MMP-12 than saline-treated mice (saline-treated: 0.78 ± 0.07 ng/mL vs. rhApoJ-treated: 0.42 ± 0.14 ng/mL, $p=0.046$) (Figure 3.B, Supplemental table 3). Interestingly, APP23 mice from group 1 presented a significant correlation between plasma MMP-12 levels and the number of large hemorrhagic cortical lesions ($Rho=0.561$, $p=0.030$) (Figure 3.C) and the volume of cortical hemorrhagic lesions ($Rho=0.754$, $p=0.001$) (Figure 3.C) detected by ex-vivo MRI, independently from the treatment group.

In order to expand the results obtained in mice, and due to the previous involvement of MMP-12 in BBB leakage and neuroinflammation in different neurological experimental models^{28–30}, we further explored the possible association between the circulating levels of MMP-12 and the cerebral hemorrhagic load in humans. For this purpose, we evaluated

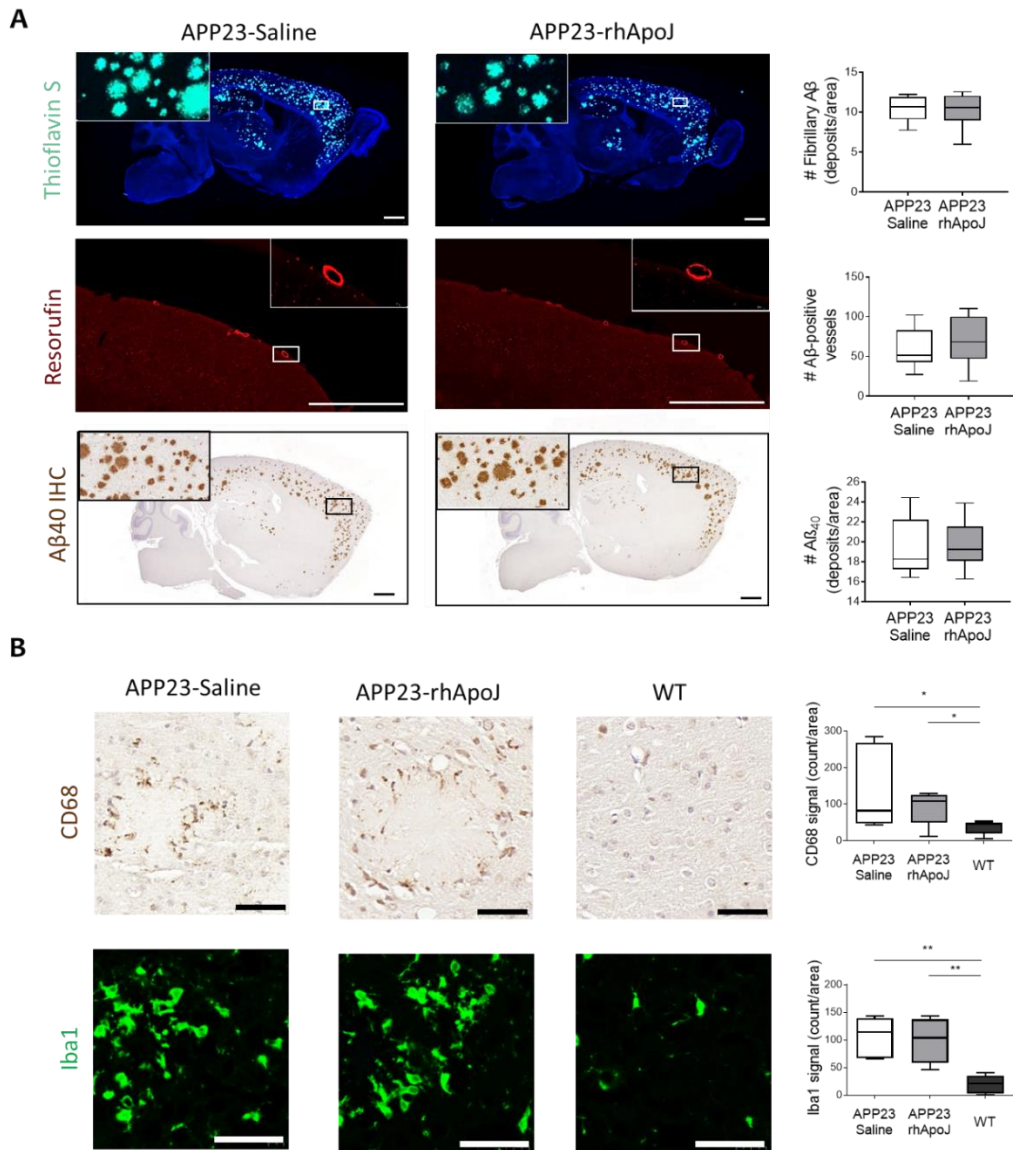


Figure 2. A) Fibrillar and vascular Aβ detection in chronically treated APP23 mice. Representative brain sections with zoom-ins of APP23 mice brains chronically treated with saline or rhApoJ and corresponding graphical quantification in both groups. Fibrillary Aβ stained with Thioflavin S in green. Vascular Aβ stained with Resorufin in red. Immunohistochemistry against Aβ₄₀ in brown. Scale bars represent 1000 μm. Data are presented as boxplots. #: count. B) Representative images of the cortex of APP23 mice brains chronically treated with saline or rhApoJ and WT mice. Immunohistochemistry against mouse CD68 is shown in brown and immunofluorescence against Iba1 in green. Graphical quantification of positive CD68 and Iba1 signal in the cortex. The bar scale represents 50 μm. Data are presented as boxplots. *:p<0.05 **:p<0.01.

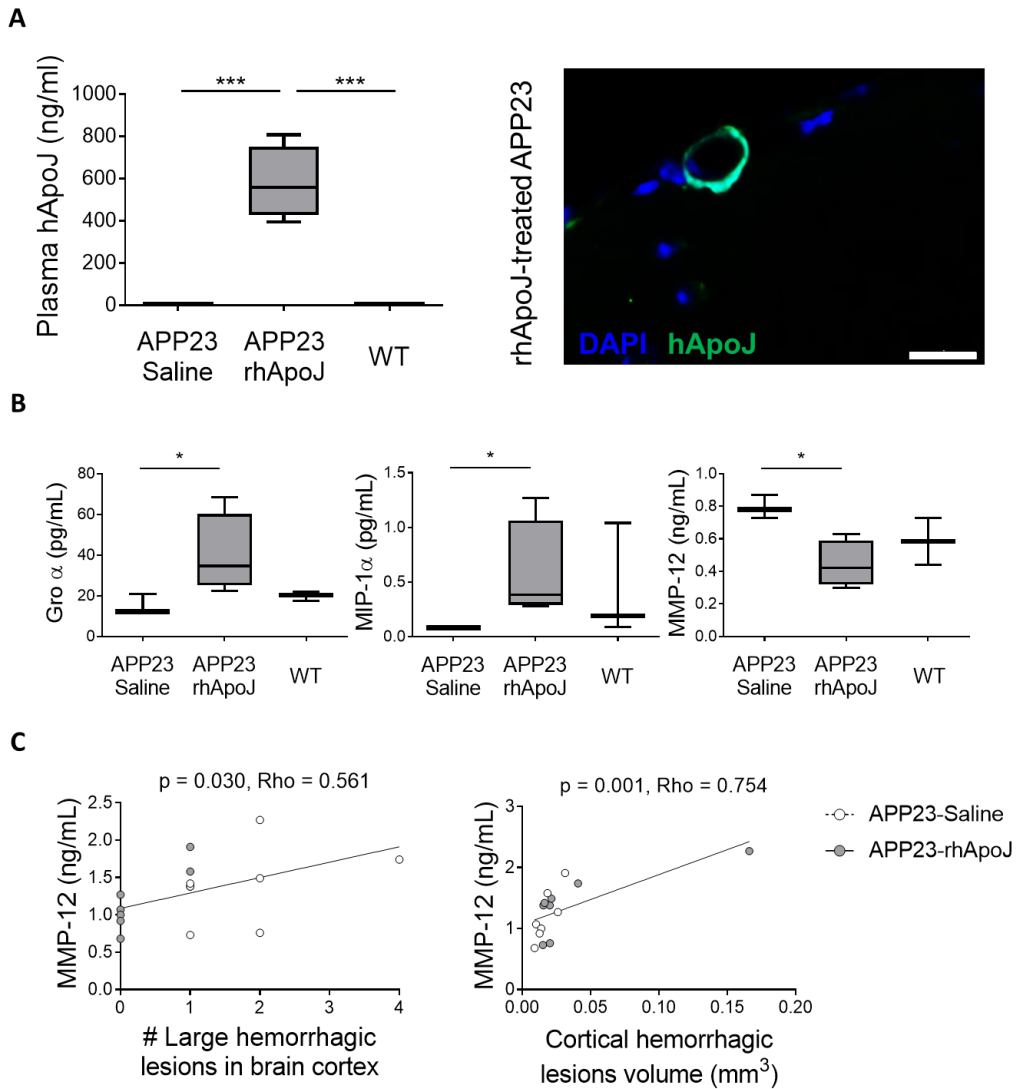


Figure 3. A) Graphical quantification of plasma human ApoJ levels (hApoJ) (ng/mL) and representative image of human ApoJ-immunodetection in a brain cortex section from a rhApoJ-treated mouse. Human ApoJ is stained in green and DAPI in blue. The scale bar represents 20 μ m. B) Graphical representation of plasma levels of Gro α (pg/mL), MIP-1 α (pg/mL), and MMP-12 (ng/mL) in mice from group 2. Data are presented as boxplots. *:p<0.05 ***:p<0.001. C) Correlation between plasma MMP-12 levels (ng/mL) and the number of large hemorrhagic lesions in brain cortex (A) and the volume (mm³) of cortical hemorrhagic lesions.

MMP-12 plasma levels in controls and ICH patients, classified according to the localization of the hemorrhage in deep areas (associated with a hypertensive

microangiopathy etiology) or lobar ICH (commonly associated with an underlying CAA pathology). A descriptive summary of the population studied can be found in Supplemental table 4. The levels of plasma MMP-12 were not different between the control subjects' samples and those obtained during the acute phase after the ICH from the patient's cohort (Supplemental table 5). MMP-12 plasma levels were not different between patients presenting a lobar or deep ICH either, although both sub-groups showed differences regarding ICH volume (lobar ICH: 28.35 [14.65—44.78] cm³, deep ICH: 7.99 [3.64—13.58] cm³, $p=0.003$), glucose levels, white blood cells count and International Normalized Ratio (INR) (Supplemental table 5). Interestingly, in the lobar ICH sub-cohort, circulating MMP-12 levels were correlated with the ICH volume (Figure 4.A) and the ICH shape (Figure 4.B), but also with the prothrombin time in the acute phase (Supplemental table 5). MMP-12 plasma levels associations with ICH shape and volume remained significant after adjusting for sex, age, and the prothrombin time by linear regression ($B=0.006$ [0.000 – 0.011], $p=0.040$ for ICH volume; and $B=0.095$ [0.007 – 0.183], $p=0.036$ for ICH shape) (Supplemental table 6).

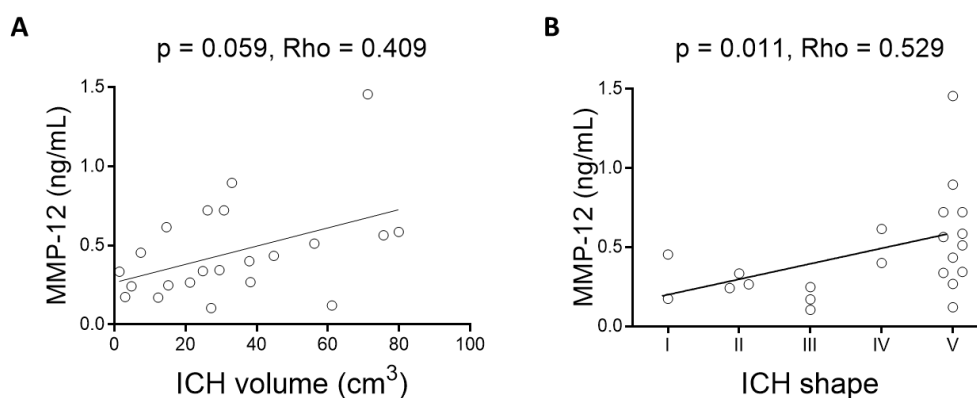


Figure 4. A) Correlation between MMP-12 plasma levels with ICH volume (cm³) and B) ICH shape from a human cohort presenting acute lobar ICH.

Discussion

Apolipoproteins constitute a family of proteins widely related to AD and CAA, specifically Apolipoprotein E (ApoE) and ApoJ, which are the most abundant in the brain. Both ApoE and ApoJ are multifunctional proteins that play a role in A β aggregation and clearance,

but also in other processes such as lipid metabolism and neuroinflammation^{31,32}. Both ApoE and ApoJ codeposit with cerebral A β in parenchyma and vasculature¹¹. In addition, APOE is the most important genetic risk factor for sporadic AD and CAA³, and CLU, which codifies for ApoJ, has also been extensively linked to AD^{33–35}. Indeed, we previously observed that a CLU single nucleotide polymorphism (SNP) was associated with the presence of lobar microbleeds in a CAA cohort³⁶. From this background, we previously studied the role of ApoJ as a target for treating AD and CAA experimentally. In this context, we tested the effect of the subchronic administration of rhApoJ in 15 months-old APP23 mice and we found that the treatment induced a reduction of A β parenchymal and vascular levels, as well as a decrease in the neurodegeneration associated with the model¹⁶. However, the impact of the treatment on cerebrovascular health and the risk of microbleeds occurrence was not evaluated due to such vascular lesions appear at an advanced stage of the pathology^{18,20}. Therefore, in the present study, 20 months old APP23 mice were chronically treated with the same dose of rhApoJ or saline and the presence of cerebral hemorrhagic lesions was determined through ex-vivo T2*-weighted MRI. The model selected was the APP23 transgenic mice for presenting cerebrovascular alterations associated with brain A β deposition, including the occurrence of spontaneous CMB linked to CAA, in contrast to other APP transgenic models¹⁷.

The main finding of our study was to demonstrate that increasing the levels of peripheral ApoJ through the chronic treatment with rhApoJ had an impact on relevant clinical endpoints associated with CAA, such as the cerebral hemorrhagic load. In this regard, we found that rhApoJ-treated APP23 mice presented a significant reduction in the number of hemorrhagic lesions in the cortex detected by MRI. Because this observation was lost when the analysis was carried out in brain deep areas, our results suggest a specific effect of the treatment on those superficial arteries more commonly affected by CAA. However, the effect of the presence of circulating rhApoJ in aged APP23 mice (23 months old) on the cerebral hemorrhagic load could not be explained by the modulation of insoluble parenchymal and/or vascular A β levels or the associated activation of microglia, since these parameters resulted to be unaltered by the treatment. Regarding A β levels and CAA load, in our previous study, we observed that the subchronic rhApoJ-treatment of middle-aged APP23 mice reduced soluble and insoluble A β levels, as well as parenchymal A β -plaque size and the number of A β -positive cerebral vessels¹⁶. In fact,

several studies have observed that the genetic alteration of CLU or the administration of ApoJ-mimetic peptides in AD transgenic mouse models are able to modulate the A β load and/or its intracerebral distribution^{37–40}. Altogether, these studies highlight a relevant function of ApoJ in regulating A β aggregation and clearance from the brain. A possible reason for the presumable discordance with our present study would be based on the age of the experimental mice used. In the current study, the A β -associated pathology was already well established and saturated with few possibilities to modulate the levels of fibrillary A β . Therefore, because rhApoJ treatment did not show an impact in terms of A β modulation in aged mice, it can be speculated that the beneficial effects of rhApoJ may be due to mechanisms related to an improvement of the cerebrovascular condition, that would be translated into a lower occurrence of CMB in aged mice or with a direct effect on A β mobilization through perivascular drainage pathways in younger mice. In this regard, we did observe an inverse correlation between the number of A β -positive vessels and parenchymal fibrillar A β deposits in the cortex of rhApoJ-treated mice specifically, which may be linked with the idea of a relevant function of ApoJ in A β clearance process³¹, inducing a redistribution of A β from parenchyma to vasculature^{3,41}.

Interestingly, after different time points of administration of rhApoJ (3 days or 30 min prior to euthanasia), the recombinant human protein was not detected inside the brain, suggesting that its mechanism of action would be through the periphery. Indeed, when mouse tissues were obtained right after the administration, rhApoJ was found in plasma and in occasional leptomenigeal vessels, as previously reported in our previous study¹⁶. How peripheral rhApoJ was able to induce the reduction of the number of CMB in the APP23 mice in the present study was not completely elucidated, although the analysis of different circulating inflammatory markers shed light on the question. In this regard, we observed a significant increase in Gro α , also known as CXCL1 and KC, and MIP-1 α , known as CCL3, levels in the plasma of rhApoJ-treated APP23 mice when compared to saline-treated APP23. It has been proposed that higher MIP1- α and Gro α circulating levels could enhance monocyte migration to the brain in an AD context where brain A β is accumulated^{42,43}. Monocytes play an important role after cerebral hemorrhage, which can potentiate inflammation but are also relevant for hematoma removal and tissue healing⁴⁴. On the other hand, we found that MMP-12 plasma levels were significantly reduced in rhApoJ-treated APP23 mice. In addition, we also observed that MMP-12 plasma levels were significantly associated with the number of large cortical

hemorrhages and the volume of cortical hemorrhagic lesions in APP23 mice. Because a link between MMP-12 and blood-brain barrier (BBB) damage in experimental models has been widely described^{28,30}, we hypothesize that the effect of the rhApoJ on the cerebrovasculature may be associated with its capacity to partially modulate MMP-12 levels. In fact, the BBB alteration in CAA has been well demonstrated⁴⁵⁻⁴⁷, which suggests that BBB damage can result in CMB development⁴⁸⁻⁵⁰. The mechanisms by which ApoJ can influence the MMP-12 levels are not clarified. However, it has been previously described that ApoJ can reduce the levels and activity of other proteins from the MMP family, such as MMP-9, MMP-3 or MMP-7⁵¹⁻⁵³. Several MMPs have been associated with CAA before and are proposed to contribute to vascular damage leading to brain bleeding⁵⁴⁻⁵⁷. In particular, MMP-12 induces BBB damage after cerebral ischemia and its levels are elevated and have a negative impact on sensorimotor function after an ICH in rodent models²⁸⁻³⁰. In addition, MMP-12 is implicated in the pathogenesis of many inflammatory diseases and secretion of MMP-12 by microglial cells is significantly upregulated by A β ₁₋₄₂ treatment in vitro^{58,59}. Actually, MMP-12 has been proposed as a promising therapeutic target for neurological diseases, including ICH⁵⁹. In this scenery, we observed for the first time a significant association between plasma MMP-12 levels and the volume of lobar ICH in a human cohort. Also, a significant association between MMP-12 plasma levels and a more irregular shape of ICH. Both volume and the irregularity of the shape are associated with hemorrhage expansion and a worse prognosis^{60,61}. With all this information, we propose that the reduction of plasma MMP-12 levels by the peripheral rhApoJ treatment could modulate the fragility of the BBB and reduce the number of hemorrhagic lesions in a cerebral β -amyloidosis context.

Our study presents some limitations, which include the relatively small sample size explained by the difficulty of obtaining a cohort of aged mice (23 months old mice) and the mortality associated with the APP23 transgenic mice⁶². Also, all mice used were females since we previously observed that female APP23 mice presented a higher brain A β accumulation¹⁷ assuming a more severe CAA pathology than male mice. On the other hand, a basal MRI to study the number of CMBs prior to treatment was not performed, mainly because of the risks associated with long anesthesia in aged mice. Another limitation of our study is related to the fact that MRI acquisitions had to be performed ex-vivo due to COVID-19 restrictions, which consequently avoided the possibility to obtain brain homogenates from group 1. Regarding the human population, our information is

restricted to CT scans since MRIs were not available for all patients. Nevertheless, we consider that our study highly contributes to expanding the knowledge about cerebral hemorrhage occurrence and the role of ApoJ and MMP-12 in CAA pathology. In conclusion, our results show that the presence of circulating rhApoJ reduces the number of cortical cerebral microbleeds and larger hemorrhages in a CAA mouse model. Although the exact molecular mechanism is yet to be elucidated, we propose that peripheral rhApoJ treatment could partially prevent the brain hemorrhagic load associated with CAA by modulating circulating MMP-12 levels. We suggest that treatments based on the upregulation of ApoJ offer a non-invasive therapeutic opportunity to ameliorate the cerebrovascular pathology associated with A β brain accumulation.

Author Contributions: Conceptualization: M.H-G.; Methodology: A.B-P., M.S., S.L-P., M.L., and P.M.; Formal analysis: A.B-P., M.H-G.; Writing—original draft preparation: A.B-P.; Writing—review and editing: M.H-G.; Supervision: M.H-G.; Funding acquisition: M.H-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), (PI17/00275, PI20/00465) and co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). The Neurovascular Research Laboratory is part of the RICORS-ICTUS-Enfermedades Vasculares Cerebrales network, ISCIII, Spain (RD21/0006/0007).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Bibliography

1. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke*. 2015;17:17–30.
2. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Frosch MP, Viswanathan A, Greenberg SM. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2017;140:1829–1850.

3. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease-one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. 2020;16:30–42.
4. Charidimou A, Boulouis G, Frosch MP, Baron J-C, Pasi M, Albuher JF, Banerjee G, Barbato C, Bonneville F, Brandner S, et al. The Boston criteria version 2.0 for cerebral amyloid angiopathy: a multicentre, retrospective, MRI-neuropathology diagnostic accuracy study. *Lancet Neurol*. 2022;21:714–725.
5. Boulouis G, Charidimou A, Greenberg SM. Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy: Pathophysiology, Neuroimaging Features, and Clinical Implications. *Semin Neurol*. 2016;36:233–243.
6. Charidimou A, Imaizumi T, Moulin S, Biffi A, Samarasekera N, Yakushiji Y, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, Baron JC, et al. Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology*. 2017;89:820–829.
7. Cordonnier C, van der Flier ; W M, Sluimer ; J D, Leys ; D, Barkhof ; F, Scheltens P. Prevalence and severity of microbleeds in a memory clinic setting. *Neurology*. 2006;66:1356–1360.
8. Wu R, Feng C, Zhao Y, Jin AP, Fang M, Liu X. A meta-analysis of association between cerebral microbleeds and cognitive impairment. *Medical Science Monitor*. 2014;20:2189–2198.
9. Poels MMF, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman PA, Niessen WJ, Krestin GP, Breteler MMB, Vernooij MW. Cerebral microbleeds are associated with worse cognitive function. *Neurology*. 2012;78:326–333.
10. Howlett DR, Hortobágyi T, Francis PT. Clusterin associates specifically with A β 40 in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain Pathol*. 2013;23:623–32.
11. Camacho J, Moliné T, Bonaterra-Pastra A, Cajal SRY, Martínez-Sáez E, Hernández-Guillamon M. Brain ApoA-I, ApoJ and ApoE immunodetection in cerebral amyloid angiopathy. *Front Neurol*. 2019;10:187.
12. Hondius DC, Eigenhuis KN, Morrema THJ, van der Schors RC, van Nierop P, Bugiani M, Li KW, Hoozemans JJM, Smit AB, Rozemuller AJM. Proteomics

- analysis identifies new markers associated with capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6:46.
13. Calero M, Tokuda T, Rostagno A, Kumar A, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin). *Biochemical Journal.* 1999;344:375–383.
 14. Beeg M, Stravalaci M, Romeo M, Carrá AD, Cagnotto A, Rossi A, Diomedea L, Salmona M, Gobbi XM. Clusterin binds to A β 1-42 Oligomers with high affinity and interferes with peptide aggregation by inhibiting primary and secondary nucleation. *Journal of Biological Chemistry.* 2016;291:6958–6966.
 15. Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, Wilson MR. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *The FASEB Journal.* 2007;21:2312–2322.
 16. Fernández de Retana S, Marazuela P, Solé M, Colell G, Bonaterra A, Sánchez-Quesada JL, Montaner J, MasPOCH D, Cano-Sarabia M, Hernández-Guillamon M. Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin modulates brain beta-amyloid levels in APP23 mice. *Alzheimers Res Ther.* 2019;11:1–17.
 17. Marazuela P, Paez-montserrat B, Bonaterra-pastra A, Solé M, Hernández-guillamon M. Impact of Cerebral Amyloid Angiopathy in Two Transgenic Mouse Models of Cerebral β -Amyloidosis: A Neuropathological Study. *Int J Mol Sci.* 2022;23:1–16.
 18. Shih AY, Hyacinth I, Hartmann DA, van Veluw SJ. Rodent models of cerebral microinfarct and microhemorrhage. *Stroke.* 2018;49:803–810.
 19. Beckmann N, Doelemeyer A, Zurbruegg S, Bigot K, Theil D, Frieauff W, Kolly C, Moulin P, Neddermann D, Kreutzer R, et al. Longitudinal noninvasive magnetic resonance imaging of brain microhemorrhages in BACE inhibitor-treated APP transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 2016;45:50–60.
 20. Reuter B, Venus A, Heiler P, Schad L, Ebert A, Hennerici MG, Grudzinski S, Fatar M. Development of cerebral microbleeds in the APP23-transgenic mouse

- model of cerebral amyloid angiopathy—a 9.4 tesla MRI study. *Front Aging Neurosci.* 2016;8:1–9.
21. Merino-Zamorano C, Retana SF de, Montañaola A, Battlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, Gosselet F, Montaner J, Hernández-Guillamon M. Modulation of Amyloid- β 1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2016;53:677–691.
 22. Fernández-De-Retana S, Cano-Sarabia M, Marazuela P, Sánchez-Quesada JL, Garcia-Leon A, Montañaola A, Montaner J, MasPOCH D, Hernández-Guillamon M. Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis. *Sci Rep.* 2017;7:1–13.
 23. Han BH, Zhou ML, Vellimana AK, Milner E, Kim DH, Greenberg JK, Chu W, MacH RH, Zipfel GJ. Resorufin analogs preferentially bind cerebrovascular amyloid: Potential use as imaging ligands for cerebral amyloid angiopathy. *Mol Neurodegener.* 2011;6:86.
 24. Macellari F, Paciaroni M, Agnelli G, Caso V. Neuroimaging in intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2014;45:903–908.
 25. Barras CD, Tress BM, Christensen S, MacGregor L, Collins M, Desmond PM, Skolnick BE, Mayer SA, Broderick JP, Diringner MN, et al. Density and shape as CT predictors of intracerebral hemorrhage growth. *Stroke.* 2009;40:1325–1331.
 26. Kozberg MG, Yi I, Freeze WM, Auger CA, Scherlek AA, Greenberg SM, van Veluw SJ. Blood–brain barrier leakage and perivascular inflammation in cerebral amyloid angiopathy. *Brain Commun.* 2022;4.
 27. Rizzi F, Caccamo AE, Belloni L, Bettuzzi S. Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells. *J Cell Physiol.* 2009;219:314–323.
 28. Chelluboina B, Klopfenstein JD, Pinson DM, Wang DZ, Vemuganti R, Veeravalli KK. Matrix metalloproteinase-12 induces blood-brain barrier damage after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2015;46:3523–3531.
 29. Wells JEA, Biernaskie J, Szymanska A, Larsen PH, Yong VW, Corbett D. Matrix metalloproteinase (MMP)-12 expression has a negative impact on sensorimotor

- function following intracerebral haemorrhage in mice. *European Journal of Neuroscience*. 2005;21:187–196.
30. Power C, Henry S, del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol*. 2003;53:731–742.
 31. Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic B v. Role of clusterin in the brain vascular clearance of amyloid- β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:8681–8682.
 32. Wojtas AM, Sens JP, Kang SS, Baker KE, Berry TJ, Kurti A, Daugherty L, Jansen-West KR, Dickson DW, Petrucelli L, et al. Astrocyte-derived clusterin suppresses amyloid formation in vivo. *Mol Neurodegener*. 2020;15.
 33. Foster EM, Dangla-Valls A, Lovestone S, Ribe EM, Buckley NJ. Clusterin in Alzheimer's disease: Mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. *Front Neurosci*. 2019;13:1–27.
 34. Lambert J-C, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009;41:1094–9.
 35. Lambert J-C. Meta-Analysis of 74,046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease. *Nat Genet*. 2013;45:1452–1458.
 36. Montañola A, de Retana SF, López-Rueda A, Merino-Zamorano C, Penalba A, Fernández-Álvarez P, Rodríguez-Luna D, Malagelada A, Pujadas F, Montaner J, et al. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med*. 2016;18:99–108.
 37. Qi XM, Wang C, Chu XK, Li G, Ma JF. Intraventricular infusion of clusterin ameliorated cognition and pathology in Tg6799 model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*. 2018;19:1–9.
 38. Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Esquerda-Canals G, Roda AR, Serra-Mir G, Lope-Piedrafita S, Sánchez-Quesada JL, Villegas S. Differential effects of apoE and apoJ mimetic peptides on the action of an anti-A β scFv in 3xTg-AD mice. *Biochem Pharmacol*. 2018;155:380–392.

39. Chen F, Swartzlander DB, Ghosh A, Fryer JD, Wang B, Zheng H. Clusterin secreted from astrocyte promotes excitatory synaptic transmission and ameliorates Alzheimer's disease neuropathology. *Mol Neurodegener.* 2021;16:1–16.
40. Wojtas AM, Carlomagno Y, Sens JP, Kang SS, Jensen TD, Kurti A, Baker KE, Berry TJ, Phillips VR, Castanedes MC, et al. Clusterin ameliorates tau pathology in vivo by inhibiting fibril formation. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8:1–11.
41. Wojtas AM, Kang SS, Olley BM, Gatherer M, Shinohara M, Lozano PA, Liu C-C, Kurti A, Baker KE, Dickson DW, et al. Loss of clusterin shifts amyloid deposition to the cerebrovasculature via disruption of perivascular drainage pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E6962–E6971.
42. Man SM, Ma YR, Shang DS, Zhao WD, Li B, Guo DW, Fang WG, Zhu L, Chen YH. Peripheral T cells overexpress MIP-1 α to enhance its transendothelial migration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2007;28:485–496.
43. Zhang K, Tian L, Liu L, Feng Y, Dong Y bin, Li B, Shang DS, Fang WG, Cao YP, Chen YH. CXCL1 Contributes to β -Amyloid-Induced Transendothelial Migration of Monocytes in Alzheimer's Disease. *PLoS One.* 2013;8:1–13.
44. Tschoe C, Bushnell CD, Duncan PW, Alexander-Miller MA, Wolfe SQ. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets. *J Stroke.* 2020;22:29–46.
45. McAleese KE, Graham S, Dey M, Walker L, Erskine D, Johnson M, Johnston E, Thomas AJ, McKeith IG, DeCarli C, et al. Extravascular fibrinogen in the white matter of Alzheimer's disease and normal aged brains: implications for fibrinogen as a biomarker for Alzheimer's disease. *Brain Pathology.* 2019;29:414–424.
46. Parodi-Rullán RM, Javadov S, Fossati S. Dissecting the crosstalk between endothelial mitochondrial damage, vascular inflammation, and neurodegeneration in cerebral amyloid angiopathy and alzheimer's disease. *Cells.* 2021;10.

47. Situ M, Citalan-Madrid AF, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic A v. Transcriptomic Profile of Blood–Brain Barrier Remodeling in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Cell Neurosci.* 2022;16.
48. Sumbria RK, Grigoryan MM, Vasilevko V, Paganini-Hill A, Kilday K, Kim R, Cribbs DH, Fisher MJ. Aging exacerbates development of cerebral microbleeds in a mouse model. *J Neuroinflammation.* 2018;15.
49. Schreiber S, Bueche CZ, Garz C, Braun H. Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? - New insights from a rat model. *Exp Transl Stroke Med.* 2013;5.
50. van Nieuwenhuizen KM, Hendrikse J, Klijn CJM. New microbleed after blood-brain barrier leakage in intracerebral haemorrhage. *BMJ Case Rep.* 2017;bcr2016218794.
51. Jeong S, Ledee DR, Gordon GM, Itakura T, Patel N, Martin A, Fini ME. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation. *American Journal of Pathology.* 2012;180:2028–2039.
52. Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270:6691–6697.
53. Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, Solomon A, Selzer MG, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC, Eye BP. Regulation of MMP-9 Activity in Human Tear Fluid and Corneal Epithelial Culture Supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1703–1709.
54. Manousopoulou A, Gatherer M, Smith C, Nicoll JAR, Woelk CH, Johnson M, Kalaria R, Attems J, Garbis SD, Carare RO. Systems proteomic analysis reveals that clusterin and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 increase in leptomeningeal arteries affected by cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017;43:492–504.
55. Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P, Domingues-Montanari S, Boada C, Penalba A, Boada M, Pagola J, Maisterra O, Rodriguez-Luna D, et al.

- MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Brain Pathology*. 2012;22:133–141.
56. Zhao L, Arbel-Ornath M, Wang X, Betensky RA, Greenberg SM, Frosch MP, Bacskai BJ. Matrix metalloproteinase 9-mediated intracerebral hemorrhage induced by cerebral amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging*. 2015;36:2963–2971.
57. Montaner J, Ramiro L, Simats A, Hernández-Guillamon M, Delgado P, Bustamante A, Rosell A. Matrix metalloproteinases and ADAMs in stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76:3117–3140.
58. Ito S, Kimura K, Haneda M, Ishida Y, Sawada M, Isobe K ichi. Induction of matrix metalloproteinases (MMP3, MMP12 and MMP13) expression in the microglia by amyloid- β stimulation via the PI3K/Akt pathway. *Exp Gerontol*. 2007;42:532–537.
59. Chelluboina B, Nalamolu KR, Klopfenstein JD, Pinson DM, Wang DZ, Vemuganti R, Veeravalli KK. MMP-12, a Promising Therapeutic Target for Neurological Diseases. *Mol Neurobiol*. 2018;55:1405–1409.
60. Boulouis G, Morotti A, Charidimou A, Dowlatshahi D,, Goldstein JN. Noncontrast Computed Tomography Markers of Intracerebral Hemorrhage Expansion. *Stroke*. 2017;48:1120–1125.
61. Al-Shahi Salman R, Frantziias J, Lee RJ, Lyden PD, Battey TWK, Ayres AM, Goldstein JN, Mayer SA, Steiner T, Wang X, et al. Absolute risk and predictors of the growth of acute spontaneous intracerebral haemorrhage: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol*. 2018;17:885–894.
62. Giménez-Llort L, Marin-Pardo D, Marazuela P, del Hernández-Guillamón MM. Survival bias and crosstalk between chronological and behavioral age: Age- and genotype-sensitivity tests define behavioral signatures in middle-aged, old, and long-lived mice with normal and ad-associated aging. *Biomedicines*. 2021;9.

Supplementary Materials

Supplementary methods

Cerebral sections staining

All stainings were performed in 4 μm -thick sagittal paraffin-embedded sections. Sections for each staining were obtained considering an equivalent depth and always contained hippocampus and striatum brain structures. In all cases, sections were deparaffinized for 1 hour at 60 °C and rehydrated before the staining.

Thioflavin S (ThS) staining

Sections were immersed in 1% ThS solution (Sigma-Aldrich) dissolved in 75% ethanol for 30 s followed by 0.1% Ths for 1 minute. Sections were then washed with 75% ethanol, dehydrated and mounted in DAPI-containing mounting media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for nuclei counterstaining.

Resorufin staining

Sections were washed with PBS and permeabilized in PBS 0.2% Triton (PBST) before being immersed in a PBS solution with Resorufin 1 mM (Sigma-Aldrich) for 5 minutes. Finally, samples were rinsed with PBS, PBS-50% ethanol, dehydrated and mounted in DAPI-containing mounting media (Vector Laboratories).

Immunohistochemistry staining

Immunohistochemistry staining was performed to specifically detect $\text{A}\beta_{40}$ and CD68. Sections were incubated with citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH=6) at 95°C for 30 minutes for antigen retrieval. Blocking was performed with 1.5% glycine, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 0.2% TBS- 1% Tween20 diluted in TBS for $\text{A}\beta_{40}$, and 10% Goat serum and 1% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS- 0.1% Tween20 for CD68 for 1 hour at room temperature (RT). Sections were then incubated ON at 4°C with the primary antibodies diluted in blocking buffer: rabbit polyclonal anti- $\text{A}\beta_{40}$ (1:5000, #AB5074P, Millipore, Temecula, CA, USA) and rabbit polyclonal anti-CD68 (1:5000, #ab125212, Abcam, Cambridge, UK). Endogenous peroxidases were blocked with 1% hydrogen peroxide treatment for 15 minutes and samples were then incubated with biotinylated anti-rabbit IgG diluted in blocking buffer (1:1000, Vector Laboratories) at RT

for 1 hour, followed by streptavidin-horseradish peroxidase (HRP; 1:1000, Vector Laboratories) 1-hour incubation at RT. Finally, sections were treated with diaminobenzidine (DAB; Dako, Glostrup, Denmark) for 15 s and Harris hematoxylin solution (Sigma-Aldrich) was used as contrast staining. For mounting, sections were dehydrated and mounted with DPX (Sigma-Aldrich). Sections incubated with only the secondary antibody were used as negative controls.

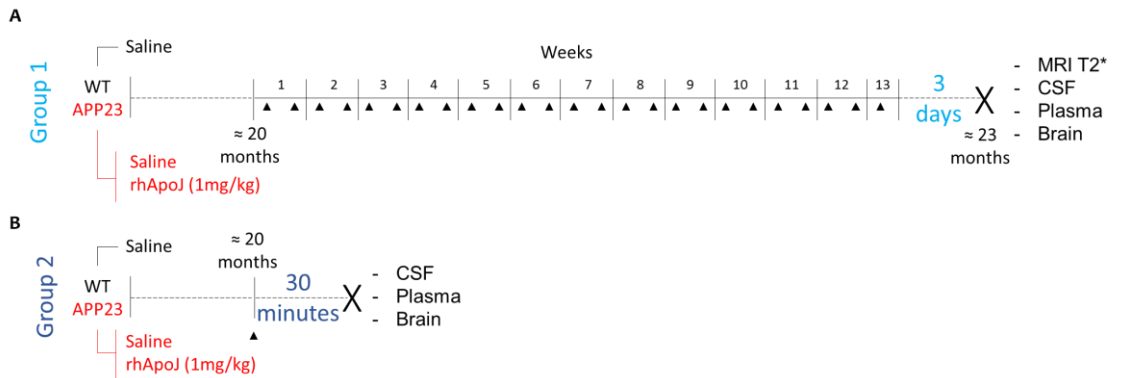
Immunofluorescence staining

Immunofluorescence staining was used to specifically detect Iba1 and human ApoJ. Sections were incubated with citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH=6) for 30 minutes at 95 °C for enhancing antigen exposure. Then, slices were blocked with 10% FBS in PBS - 0.1% Tween20 and incubated ON at 4°C with the primary antibodies: Iba1 (1:200, #ab178847, Abcam) and hApoJ (1:50, #ab39991, Abcam). The next day, samples were incubated with the secondary antibodies anti-rabbit-488 for Iba1 (1:500, Invitrogen) and anti-goat-IgG-488 for hApoJ (1:500, Invitrogen) diluted in blocking buffer for 1 hour at RT. Sections were finally dehydrated and mounted with DAPI counterstaining (Vector Laboratories). Sections incubated with only the secondary antibody were used as negative controls.

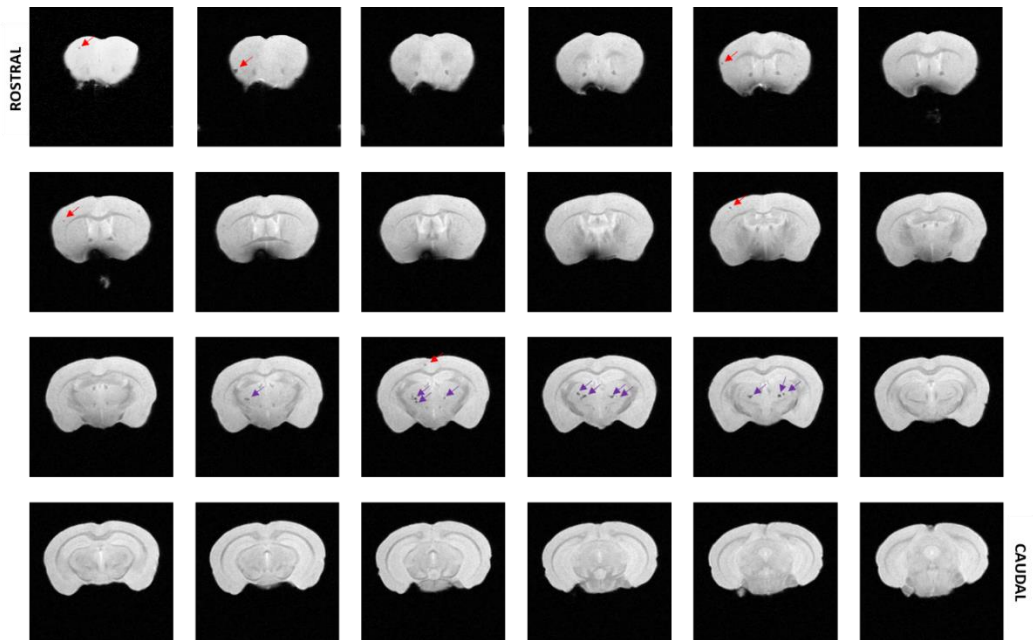
Quantification of cerebral staining

For all staining techniques, except Resorufin, the brain region of interest was delimited (cortex, hippocampus, thalamus, or the whole brain except for the olfactory bulb and cerebellum) and the area was measured. The number of positive particles was quantified and divided by the area (# of deposits/area (μm^2)), and the percentage of the positive area (%) and the average size of the deposits (μm^2) were calculated. For the quantification of vessels positive for A β , they were manually determined in ThS, Resorufin and A β 40-IHC stained sections in the selected area (leptomeninges, cortex, leptocortex, hippocampus, thalamus or the whole brain except for the olfactory bulb and cerebellum).

Supplementary figures and tables



Supplemental Figure 1. Study timeline for A) group 1 and B) group 2. Black triangles represent each administration. Crosses in the diagrams represent euthanasia.



Supplemental Figure 2. Representation of T2*-weighted MRI cerebral sections of 23 months old chronically saline-treated APP23 mice from rostral to caudal. Cortical CMB are indicated with red arrows and deep CMB with purple arrows.

Supplemental Table 1. A β parenchymal levels analyzed by Ths and A β ₄₀ IHC in APP23 mice chronically treated with saline/rhApoJ.

	Brain location	APP23-Saline n=8	APP23-rhApoJ n= 7	p	
ThS-positive deposits	# Fibrillary Aβ (deposits/ area)	Cortex	21.86 \pm 3.17	20.48 \pm 4.80	0.517
		Hippocampus	15.04 \pm 3.54	16.72 \pm 4.15	0.414
		Thalamus	6.99 \pm 2.29	6.91 \pm 3.27	0.957
		Total	10.38 \pm 1.57	10.21 \pm 2.20	0.867
	Percentage of fibrillary Aβ (%)	Cortex	9.73 \pm 2.42	8.75 \pm 2.45	0.449
		Hippocampus	6.39 \pm 2.38	6.57 \pm 2.3	0.879
		Thalamus	3.49 \pm 1.43	2.89 \pm 1.60	0.459
		Total	4.63 \pm 1.11	4.31 \pm 1.3	0.608
	Average Size of fibrillary Aβ deposits (μm²)	Cortex	4459.66 \pm 902.33	4301.40 \pm 1101.7	0.764
		Hippocampus	4288.15 \pm 1441.66	3965.34 \pm 1166.91	0.645
		Thalamus	5067.77 \pm 1906.77	4154.20 \pm 1228.76	0.298
		Total	4465.10 \pm 824.22	4186.05 \pm 1001.73	0.564
Aβ₄₀-positive deposits	# Aβ₄₀ (deposits/area)	Cortex	35.91 \pm 5.17	36.10 \pm 3.19	0.933
		Hippocampus	22.12 \pm 5.57	25.15 \pm 5.98	0.328
		Thalamus	17.00 \pm 11.58	17.16 \pm 7.20	0.978
		Total	19.19 \pm 2.77	19.12 \pm 2.02	0.957
	Percentage of Aβ₄₀ (%)	Cortex	7.86 \pm 1.73	8.41 \pm 2.00	0.577
		Hippocampus	4.91 \pm 2.50	6.00 \pm 1.45	0.333
		Thalamus	1.56 [0.98 – 1.90]	2.23 [1.31 – 4.23]	0.336
		Total	3.84 \pm 0.72	4.14 \pm 1.19	0.557
	Average Size of Aβ₄₀ deposit (μm²)	Cortex	2180.46 \pm 308.50	2328.88 \pm 522.79	0.508
		Hippocampus	2194.21 \pm 849.41	2407.52 \pm 339.38	0.546
		Thalamus	1024.57 \pm 528.90	1510.57 \pm 928.77	0.227
		Total	2006.87 \pm 279.29	2145.32 \pm 500.46	0.512

Supplemental Table 2. Association of the number of vessels positive for resorufin, ThS and A β_{40} with chronic treatment in APP23 mice.

	Location	APP23-Saline n=8	APP23-rhApoJ n=7	p
Resorufin-positive vessels	Leptomeninges	14.63 \pm 8.07	12.14 \pm 10.04	0.604
	Cortex	7.50 [3.00 – 17.50]	12.00 [2.00 – 29.00]	0.779
	Leptocortex	23.88 \pm 12.98	26.00 \pm 22.49	0.823
	Hippocampus	1.00 [0 – 4.50]	0 [0 – 3.00]	0.463
	Thalamus	23.38 \pm 8.45	32.71 \pm 11.13	0.088
	Total	59.63 \pm 24.96	68.29 \pm 30.72	0.557
ThS-positive vessels	Leptomeninges	23.50 \pm 5.53	20.86 \pm 1.95	0.238
	Cortex	7.50 [3.75 – 13.25]	13.00 [1.00 – 20.00]	0.867
	Leptocortex	33.88 \pm 13.32	34.00 \pm 12.33	0.985
	Hippocampus	2.00 [1.25 – 3.00]	1.00 [0 – 5.00]	0.336
	Thalamus	37.5 \pm 28.13	42.71 \pm 17.26	0.678
	Total	73.00 [56.50 – 94.25]	98.00 [87.00 – 100.00]	0.336
Aβ_{40}-positive vessels	Leptomeninges	33.88 \pm 13.58	29.71 \pm 10.40	0.522
	Cortex	31.38 \pm 26.34	33.14 \pm 22.67	0.892
	Leptocortex	65.25 \pm 33.04	62.86 \pm 30.93	0.888
	Hippocampus	27.00 [17.00 – 42.50]	22.00 [17.00 – 52.00]	0.779
	Thalamus	2.00 [0.00 – 10.00]	2.00 [1.00 – 6.50]	0.867
	Total	116.00 [82.50 – 133.50]	125.00 [95.50 – 147.00]	0.779

Supplemental Table 3. Association of plasma levels of inflammation markers and MMPs with acute treatment in APP23 mice, and WT.

Acute treatment	APP23-Saline n=3	APP23-rhApoJ n=4	WT n=3	p
Gro α (pg/mL)	12.14 [11.78 – 16.56]	34.73 * [28.33 – 51.82]	20.21 [18.88 – 21.04]	0.030
IL-1 β (pg/mL)	0.11 [0.11 – 12.29]	0.11 [0.11 – 1.20]	5.01 [4.33 – 6.36]	0.145
IL-10 (pg/mL)	1.33 [0.81 – 4.68]	11.02 [4.75 – 27.63]	5.66 [2.97 – 21.37]	0.481
IL-17A (pg/mL)	3.65 [3.30 – 4.89]	4.69 [2.94 – 6.43]	3.34 [3.14 – 10.67]	0.962
MCP-1 (pg/mL)	4.10 [4.10 – 4.10]	5.35 [4.73 – 24.82]	56.63 * [35.42 – 57.72]	0.035
MIP-1 α (pg/mL)	0.08 [0.08 – 0.08]	0.38 * [0.30 – 0.86]	0.19 [0.14 – 0.62]	0.040
MIP-1 β (pg/mL)	0.60 [0.60 – 0.66]	1.58 [0.95 – 2.14]	1.30 [0.95 – 5.06]	0.719
MIP-2 α (pg/mL)	2.49 \pm 1.50	5.07 \pm 3.70	4.67 \pm 4.65	0.630
MMP-2 (ng/mL)	440.80 [415.85 – 559.60]	434.30 [414.80 – 480.60]	361.60 [359.95 – 375.65]	0.057
MMP-3 (ng/mL)	33.60 [28.45 – 35.25]	43.80 [37.10 – 61.35]	37.10 [31.30 – 192.10]	0.211
MMP-8 (ng/mL)	124.60 [115.85 – 164.90]	144.90 [124.05 – 203.90]	116.70 [111.55 – 220.75]	0.815
proMMP-9 (ng/mL)	12.37 [11.55 – 17.56]	14.21 [11.03 – 26.80]	7.72 [7.62 – 19.43]	0.554
MMP-12 (ng/mL)	0.78 \pm 0.07	0.42 \pm 0.14 *	0.59 \pm 0.21	0.042

Inflammation markers are expressed as pg/mL and MMps as ng/mL. * p<0.05 vs. APP23-Saline.

Supplemental Table 4. Demographic and clinical characteristics of the study cohort. * $p < 0.05$ vs. Controls. ICH: Intracerebral hemorrhage.

	Controls n=17	Deep ICH n=18	Lobar ICH n=22	p
Sex (female)	8 (47.1%)	9 (50.0%)	13 (59.1%)	0.730
Age	72.0 [65.0 — 74.0]	79.5* [73.0 — 87.0]	82.0* [70.0 — 85.0]	0.001
MMP-12 (ng/mL)	0.38 [0.24 — 0.53]	0.39 [0.20 — 0.98]	0.37 [0.25 — 0.59]	0.997
HTA	7 (41.2%)	9 (50.0%)	16 (72.7%)	0.118
Atrial fibrillation	10 (58.8%)	4 (22.2%)	2* (9.1%)	0.002
Diabetes Mellitus	2 (11.8%)	7 (38.9%)	3 (13.6%)	0.080
ICH volume (cm³)		7.99 [3.64 — 13.58]	28.35 [14.65 — 44.78]	0.003
Cholesterolemia		8 (44.4%)	7 (31.8%)	0.412
ApoEε2		2 (11.1%)	4 (21.1%)	0.660
ApoEε4		4 (22.2%)	4 (21.1%)	1.000
Creatinin (mg/dL)		0.73 [0.64 — 0.92]	0.80 [0.72 — 1.07]	0.165
Fibrinogen (g/L)		3.69 ± 0.68	4.13 ± 0.65	0.055
Glucose (mg/dL)		129.50 [104.0 — 164.0]	113.00 [95.0 — 127.0]	0.021
Hemoglobin (g/dL)		13.61 ± 1.42	13.32 ± 1.94	0.603
Anticoagulant treatment		4 (20%)	2 (8%)	0.383
International Normalized Ratio (INR)		1.06 [1.00 — 1.19]	0.99 [0.93 — 1.03]	0.017
Platelets (units/nL)		190.56 ± 34.99	214.73 ± 55.33	0.116
Prothrombin time (s)		12.85 [12.25 — 14.55]	12.10 [11.20 — 13.30]	0.075
Partial thromboplastin time (s)		29.90 [27.20 — 33.00]	27.30 [24.50 — 30.70]	0.141
White blood cells (units/nL)		6.87 ± 1.56	8.83 ± 3.25	0.018

Supplemental Table 5. Association between plasma MMP-12 levels and demographic and clinical variables from the ICH cohort represented by the p value obtained from the corresponding analysis

MMP-12 associations

	Deep ICH n=18	Lobar ICH N=22	All ICH N=40
Sex	0.931	0.357	0.600
Age	0.634	0.762	0.523
HTA	0.297	0.590	0.233
Atrial fibrillation	0.574	0.364	0.288
Diabetes Mellitus	0.724	0.857	0.634
ICH volume	0.687	0.059	0.501
ICH Shape	0.633	0.011	0.254
Cholesterolemia	0.122	0.332	0.600
ApoEε2	0.837	0.307	0.481
ApoEε4	1.000	0.665	0.677
Creatinin	0.948	0.918	0.671
Fibrinogen	0.753	0.529	0.455
Glucose	0.769	0.649	0.698
Hemoglobin	0.195	0.231	0.849
Anticoagulant treatment	0.574	0.364	0.288
International Normalized Ratio (INR)	0.116	0.170	0.058
Platelets	0.185	0.587	0.187
Prothrombin time	0.043	0.072	0.007
Partial thromboplastin time	0.535	0.191	0.168
White blood cells	0.338	0.215	0.055

Supplemental table 6. Linear regression with MMP-12 plasma levels in a lobar ICH cohort adjusting by sex, age and prothrombin time.

A)

	B [CI 95%]	p-value
ICH volume	0.006 [0.000 — 0.011]	0.040
Sex	—	—
Age	—	—
Prothrombin time	—	—

B)

	B [CI 95%]	p-value
ICH Shape	0.095 [0.007 — 0.183]	0.036
Sex	—	—
Age	—	—
Prothrombin time	—	—

Discussió



Actualment la β -amiloïdosi cerebral té un impacte socioeconòmic devastador en la societat, englobant la MA, principal causa mundial de demència, i l'AAC, la qual és una causa freqüent d'hemorràgia intracerebral lobar en adults d'edat avançada. Tot i això, els mecanismes fisiopatològics segueixen sense estar clars, sense teràpies efectives per cap de les dues malalties. Hi ha molts factors que indiquen una relació entre el metabolisme lipídic i la β -amiloïdosi cerebral, però el rol exacte segueix sent desconegut. En aquest sentit, el paper de les lipoproteïnes i apolipoproteïnes plasmàtiques així com els seus nivells en l'AAC i MA segueix sense estar definit. La nostra hipòtesi era que nivells circulants d'ApoJ i ApoE i la seva distribució en les diferents lipoproteïnes estaven associats amb l'acumulació i localització de l'A β cerebral. Per tal d'estudiar aquesta hipòtesi, en aquesta tesi doctoral vam estudiar l'associació dels nivells d'aquestes apolipoproteïnes en plasma i a les diferents lipoproteïnes amb marcadors radiològics de malaltia de petit vas en pacients amb sospita clínica d'AAC. Per altra banda, vam comparar el perfil lipídic i la distribució d'ApoJ i ApoE en les lipoproteïnes plasmàtiques en pacients amb AAC, MA i controls. Per últim, degut a la capacitat d'ApoJ d'actuar com a xaperona i evitar l'agregació d'A β , així com de promoure l'aclariment d'A β en models experimentals *in vivo*, vam decidir aprofundir en el potencial efecte terapèutic d'augmentar els nivells circulants d'ApoJ en un model envellit de la malaltia. En particular, vam estudiar l'efecte de l'administració d'ApoJ recombinant humana en l'afectació cerebrovascular causada per l'AAC en el model de ratolí APP23 valorant la presència de microsagnats cerebrals detectats per RMN.

1. Estudi de marcadors radiològics en una cohort amb HIC lobar i sospita d'AAC

Tot l'estudi dels marcadors radiològics es va dur a terme en una cohort multicèntrica de 126 pacients amb HIC lobar i sospita d'AAC (estudi 1).

1.1 Associacions genètiques amb marcadors radiològics comuns en l'AAC

Per entendre els mecanismes implicats en l'AAC relacionats amb el procés de β -amiloïdosi cerebral, vam decidir estudiar diferents SNPs prèviament relacionats amb la MA (235,236) en una cohort amb HIC lobar i sospita clínica d'AAC. En concret, en aquest estudi vam estudiar diferents SNPs associats a 15 gens, en concret a: APOE, CLU, ABCA7, PICALM, BIN1, SORL1, PTK2B, EPHA1, CD33, CD2AP, MS4A6A, HLA-DRB5/HLA-DRB1, TREM1, TREM2 i TREML2. La majoria d'aquests gens s'han associat

amb la MA en diferents estudis i GWAs (236,330). En aquest estudi ens vam basar principalment en el GWAS més gran fet fins al moment que consistia en 74046 individus totals, 25580 dels quals tenien MA (235). És important recalcar que GWASs més recents han corroborat l'associació de molts d'aquests gens amb la MA (239,240). Més concretament, vam decidir avaluar l'associació d'aquests SNPs amb marcadors radiològics de malaltia de petit vas associats a l'AAC com són la SSc, EPVD-CSO, LSB, microsagnats corticals, atròfia cerebral i l'escala CAA-SVDB. Com hem explicat a la Introducció, els mecanismes patofisiològics que porten a l'aparició d'aquests marcadors encara no són coneguts i a més, la seva implicació en la clínica encara no està clara. De fet, en un estudi longitudinal recent, han descrit com la presència de SSc seria predictora de patir una HIC (374) i, en altres estudis, els microsagnats cerebrals també s'han associat amb la progressió d'AAC i el risc de recurrència d'HIC (34,88). En aquest sentit, altres marcadors radiològics com la SSc (95,96) o LSB (99,100) també s'han associat al risc hemorràgic o deteriorament cognitiu. Considerem que és essencial obtenir més informació sobre les associacions entre aquests marcadors radiològics i diferents vies moleculars per tal d'entendre millor la seva fisiopatologia i la seva implicació en la malaltia. A més, pensem que la cohort estudiada és representativa de pacients amb sospita clínica d'AAC, amb una prevalença de marcadors radiològics associats a l'AAC esperada. A més, la cohort presenta una severitat de malaltia de petit vas associada a l'AAC variada, amb un 45% dels casos presentant un grau baix d'AAC-SVDB i un 55% de casos amb un grau alt. Aquesta variabilitat ens permet estudiar els mecanismes implicats en l'AAC i l'impacte dels diferents marcadors radiològics associats a malaltia de petit vas.

1.1.1 Associacions genètiques de risc/protecció en la MA i l'AAC

En aquest estudi (estudi 1) en el que s'analitzaven variants genètiques en una cohort amb HIC lobar i sospita clínica d'AAC, hem observat que la direcció de risc/protecció en la freqüència d'al·lels minoritaris dels SNPs en molts casos no coincidia amb els resultats descrits per la MA. Més concretament, en la nostre cohort hem observat que ABCA7 rs3764650 (G) es troba en menor freqüència en pacients amb una major presència i més microsagnats corticals, així com en pacients amb nivells més alts de l'escala CAA-SVDB, suggerint un efecte protector en l'AAC. En canvi, s'ha descrit prèviament com a factor de risc per la MA, sense tenir una influència directe en l'AAC a nivell patològic (375). Tot i així, cal tenir en compte que bibliografia prèvia recolzaria un paper rellevant d'aquest

gen en l'AAC, ja que altres SNPs d'ABCA7 s'han associat amb malalties de petit vas, tant isquèmica com AAC (155,376). Un altre exemple és TREML2 rs3747742 (C), prèviament descrit com a factor protector per la MA (377) i que en la nostra cohort s'associava a un número alt de microsagnats lobars i amb l'escala CAA-SVDB. També, EPHA1 rs11767557 (C), SNP descrit de risc per MA (376,378), en la nostra cohort es va associar a menors nivells en l'escala CAA-SVDB. En aquest cas, també s'ha descrit que altres mutacions en el gen EPHA1 estan associades a malaltia de petit vas isquèmic (376,378). El fet que els resultats obtinguts en la cohort d'HIC lobar tinguin una interpretació contrària en termes de risc/protecció dels descrits en la MA no és del tot sorprenent, ja que això mateix passa amb l'al·lel APOEε2, sent protector per la MA però associat a major risc hemorràgic en l'AAC (2). Aquests resultats demostren la complexitat de la β-amiloïdosi cerebral i ressalten les diferències entre la MA i l'AAC. De fet, s'ha proposat que aquests gens podrien afectar a la β-amiloïdosi cerebral a partir de la seva implicació en l'aclariment d'Aβ (155,229,377). D'aquesta manera, possibles alteracions funcionals en les proteïnes codificades podrien afectar a la redistribució d'Aβ cerebral del parènquima a la vasculatura i per tant, tenir efectes contraris en la MA i l'AAC. De totes maneres, cal tenir en compte que aquests gens estan implicats també en molts altres mecanismes que poden influir de manera diferent en les dues patologies, com el manteniment de la integritat de la BHE o la patologia associada a tau (375,377,379,380).

1.1.2 Genotip de CLU en l'AAC

Pel que fa al genotip de CLU, el gen que codifica per ApoJ, vam estudiar 4 SNPs diferents i vam observar que tots ells estaven associats amb algun dels marcadors radiològics d'AAC. En aquest cas però, els SNPs anaven en la mateixa direcció de risc/protecció que el que estava descrit per la MA.

Més concretament, vam observar una associació de rs7012010 (C) amb el grau de EPVD-CSO, la presència de microsagnats lobars i atròfia cerebral; i rs9331888 (G) amb la presència de SSc, grau de LSB i severitat de l'escala CAA-SVDB. Aquests resultats indiquen una associació d'aquests SNPs amb una major severitat de malaltia de petit vas i probablement d'AAC, anant en línia amb resultats previs on s'han descrit rs7012010 (C) i rs9331888 (G) com marcadors de risc per la MA (327,330,332,381). Per altra banda, en el nostre estudi, rs9331896 (C) es va associar a un menor grau de LSB i de l'escala

CAA-SVDB. En canvi, rs11136000 (T) es va associar amb un menor número de microsagnats lobars confirmant resultats previs del nostre grup on havíem vist una associació d'aquest SNP amb l'absència de microsagnats lobars (156). Aquests resultats indiquen efectes protectors de rs11136000 (T) i rs9331896 (C) per processos relacionats amb l'AAC, anant en línia amb resultats previs que els descriuen com factors protectors per la MA (327).

Cal destacar que diferents mutacions al mateix gen poden causar afectacions semblants o totalment diferents a la proteïna final, tenint sentit que algunes mutacions siguin protectores i altres de risc. En aquest sentit, un estudi recent descriu com diferents variacions genètiques a CLU s'associaven a HIC lobar, un tret clínic característic de l'AAC, resultats que anirien en la línia dels nostres resultats i confirmarien el paper fonamental d'ApoJ en l'AAC (382).

Tot i que l'afectació exacte d'aquests SNPs encara no es coneix, se sap que diversos SNPs de CLU afecten l'expressió i nivells d'ApoJ (332–335,383,384). De fet, l'SNP rs11136000 (T) s'ha associat a majors nivells d'expressió d'ApoJ cerebral en pacients de MA i controls (383,384). Tot i així, altres estudis han trobat resultats divergents sobre el seu impacte en plasma de controls, pacients amb MA i amb sospita d'AAC (156,385,386). En aquest sentit, en el nostre estudi tampoc vam observar canvis en els nivells plasmàtics d'ApoJ segons el genotip però sí en la distribució d'ApoJ en les diferents lipoproteïnes. Concretament, els 2 SNPs que resultaven ser protectors en la nostra cohort (rs11136000 (T) i rs9331896 (C)) es van associar a majors nivells d'ApoJ en HDL. A més, el fet que el genotip no afecti als nivells plasmàtics, però sí als nivells d'ApoJ en HDL indicaria la importància del metabolisme lipídic i la composició de les lipoproteïnes en l'AAC.

1.1.3 Genotip d'APOE en l'AAC

Tot i la importància del genotip d'APOE en l'AAC com s'ha descrit a la secció de la Introducció, en aquest estudi no vam trobar cap associació significativa entre el genotip d'APOE i els marcadors radiològics de petit vas associats a l'AAC, però sí una tendència estadística entre APOE ϵ 2 i un grau més alt en l'escala CAA-SVDB. En aquest sentit, estudis previs sí que havien observat una associació entre APOE ϵ 4 i microsagnats lobars (387) i APOE ϵ 2 amb l'extensió de la SSc (152) i la presència de HSA (388), tot i que aquests resultats tampoc s'han pogut confirmar del tot en altres estudis

(156,387,389). Pel que fa als nivells plasmàtics d'ApoE associats al genotip, hem observat majors nivells d'ApoE en plasma i LDL en portadors d'APOEε2 i menors nivells d'ApoE plasmàtics en portadors d'APOEε4. L'associació entre el genotip i els nivells plasmàtics ha estat extensament descrita prèviament en diferents poblacions, incloent controls, pacients amb MA i amb AAC (156,390), però els seus nivells en lipoproteïnes no han estat tan estudiats. També cal tenir en compte que el genotip d'APOE, apart d'alterar els nivells de la proteïna, també pot alterar la seva funció (319).

1.2 Relació entre ApoJ i ApoE circulants i marcadors de neuroimatge característics de l'AAC

Degut a l'associació que vam observar entre els diferents SNPs de CLU i els marcadors radiològics característics de l'AAC, així com dels resultats descrits prèviament sobre l'impacte d'ApoJ i ApoE en la β-amiloïdosi cerebral, vam decidir aprofunditzar en l'estudi d'aquestes proteïnes analitzant els seus nivells plasmàtics i la distribució en lipoproteïnes amb l'objectiu d'entendre millor la implicació biològica dels marcadors de RMN associats a l'AAC .

Els resultats obtinguts van mostrar com menors nivells d'ApoJ en LDL i d'ApoE en plasma i HDL estaven associats a la presència i grau d'EPVD-CSO. De fet, els EPVD-CSO s'han associat a una major acumulació d'Aβ tant en AAC com en MA en estudis histopatològics (106–108). Tenint això present, s'ha proposat que els EPVD-CSO podrien ser deguts a una disminució del drenatge perivascular d'Aβ causant acumulació de líquid intersticial als EPV i dilatant-los (108–110). Prèviament s'ha descrit que el tractament amb ApoJ en un model de ratolí que presenta aterosclerosi millora la capacitat antioxidant i d'efluxió de colesterol de les HDL, indicant capacitats ateroprotectors d'ApoJ(391). En aquest sentit, majors nivells d'ApoE també es consideren ateroprotectors (324) i de fet, HDLs enriquides amb ApoE són capaces de disminuir l'acumulació vascular d'Aβ en un model d'AAC *in vitro* (392). Per altra banda, en el nostre estudi, en una cohort amb HIC lobar i sospita clínica d'AAC, també vam observar que menors nivells d'ApoJ en HDL estaven associats amb la presència i la severitat d'atròfia cerebral (113); i menors nivells d'ApoE a les LDL amb l'extensió de SSc. Amb aquests resultats, proposem que nivells més elevats d'ApoJ i ApoE en LDL i HDL poden potenciar el drenatge d'Aβ a nivell vascular, tenint propietats protectores en l'AAC. Així, l'ApoE i l'ApoJ podrien dur a terme aquest drenatge d'Aβ a través de lligands

molt estudiats com el receptor LDL, receptor d'ApoE, receptor de VLDL, LRP1 i megalina.

1.3 Limitacions de l'estudi i perspectives de futur per l'estudi de marcadors radiològics de malaltia de petit vas associats a l'AAC

Considerem que aquest estudi destaca la rellevància del metabolisme lipídic amb la funcionalitat cerebrovascular en l'AAC i que obre les portes a noves estratègies terapèutiques. De totes maneres, segueix sent necessari seguir investigant en aquest camp en altres cohorts més àmplies. Cal tenir en compte que alguns dels resultats observats en aquest estudi podrien ser deguts al fenotip hemorràgic, tot i que es va evitar analitzar plasma obtingut durant la fase aguda d'HIC. Tampoc podem confirmar la causalitat dels resultats obtinguts degut a la naturalesa de l'estudi observacional. En un futur, seria interessant realitzar l'estudi amb un grup control que presenti una hemorràgia d'etiologia diferent. En aquest estudi (N=126), 108 pacients presentaven AAC pur sense microhemorràgies profundes, dels quals 30 presentaven AAC possible, 74 AAC probable i 4 AAC confirmada amb mostra histopatològica segons els criteris de Boston 1.5 (56). Seria interessant analitzar els resultats estudiant només pacients amb AAC probable o confirmada o re-classificar-los segons els nous criteris de Boston 2.0. De totes maneres, considerem que el fet d'haver inclòs pacients amb AAC possible segons els criteris de Boston 1.5 ens aporta un perfil de pacients amb menys afectació cerebrovascular, útil per permetre'ns comparar la severitat de l'afectació de malaltia de petit vas. A més, seria interessant dur a terme un estudi prospectiu que permetés fer un seguiment de l'evolució del dany cerebrovascular i analitzar el potencial predictiu de la distribució d'ApoJ i d'ApoE en les lipoproteïnes. Per últim, també caldria estudiar diferents afectacions clíniques de l'AAC, més enllà de la presència de l'HIC lobar i marcadors de RMN.

2. Comparació del perfil lipídic en pacients amb β -amiloïdosi cerebral

Degut a que tant la MA com l'AAC tenen com a característica principal l'acumulació d'A β cerebral, hi ha un solapament entre els mecanismes fisiopatològics d'ambdues. La diferència principal entre les dues patologies és la localització d'A β , trobant-se en forma de plaques al parènquima en la MA, i acumulada als vasos en l'AAC (2). Aquesta diferència en la localització dels dipòsits d'A β comporta que les lesions causades en les dues patologies siguin

diferents; provocant una pèrdua de disfunció sinàptica i mort neuronal en el cas de la MA (2) i una degeneració dels vasos sanguinis cerebrals, fent-los més propensos a patir una ruptura, en l'AAC (9). Tot i així, molts mecanismes entre les dues patologies convergeixen. En les dues patologies es creu que l'acumulació d'A β és deguda a un desequilibri entre la producció i aclariment del pèptid A β (8). I a més, de manera més específica, s'ha identificat la disfunció vascular com un estadi primerenc de la MA (393). En aquest sentit, també s'ha descrit que els pacients amb MA tenen una major prevalença de microsgnats corticals (394), tret característic de l'AAC i s'han relacionat marcadors radiològics de malaltia de petit vas amb la MA (395). Tot i que les dues malalties presenten una simptomatologia diferenciada, actualment no hi ha biomarcadors capaços de distingir-les en la pràctica clínica. En aquest estudi pretenem comparar el perfil lipídic de pacients amb MA i AAC.

Per tal de dur a terme aquest estudi, vam determinar i comparar el perfil lipídic i la distribució d'ApoJ i ApoE en les lipoproteïnes circulants de pacients amb AAC i MA (estudi 2; (396)). Els pacients amb AAC van ser seleccionats de la cohort de l'estudi 1, i tots complien amb un diagnòstic de possible (n=11), probable (n=37), o AAC confirmada amb histopatologia (n=3) segons els criteris de Boston 1.5 (56). A més, cap dels pacients seleccionats per la cohort representativa d'AAC presentava demència. En aquest estudi volíem analitzar si el perfil lipídic plasmàtic complet podia aportar informació sobre marcadors funcionals o quantitius dels diferents tipus de β -amiloïdosi cerebral. Cal assenyalar que no vam trobar diferències entre els factors de risc cardiovascular estudiats (HTA, DM), el genotip d'ApoE o l'ús d'estatines entre els diferents grups estudiats, indicant que els resultats obtinguts no depenien d'aquests factors.

2.1 Nivells de colesterol en β -amiloïdosi cerebral

En termes generals, a l'estudi 2 vam observar que el perfil lipídic dels pacients amb AAC presentava moltes més alteracions que el de pacients amb MA en comparació a una població control.

Concretament, el perfil dels pacients d'AAC que havien patit una HIC lobar es podia considerar ateroprotector des d'un punt de vista cardiovascular,

presentant nivells més baixos de colesterol total i de colesterol LDL. Aquests resultats encaixen amb estudis previs on s'han descrit nivells baixos de colesterol i colesterol LDL associats amb risc d'HIC (71,397–399) i de microsagnats cerebrals lobars (295,400). Considerem important ressaltar que els nostres resultats aporten informació nova ja que indiquen que aquest perfil no és només un fenomen de la fase aguda, sinó que els nivells baixos de colesterol segueixen presents en una fase crònica, temps en el que es va extreure la sang en la nostra cohort després d'haver patit l'HIC lobar. En aquest sentit, s'ha descrit una disminució dels nivells de colesterol LDL des de 6 mesos abans de patir l'HIC (401), indicant que aquesta disminució no és una conseqüència de l'hemorràgia. És rellevant recordar que, com hem comentat prèviament, nivells baixos de colesterol LDL s'han associat a un pitjor pronòstic amb un volum d'HIC més gran, resolució de l'hematoma més lenta i fins i tot, una major mortalitat després de l'HIC (292,293). El genotip ApoEε2, un factor de risc molt important per patir HIC associada a l'AAC (150), està relacionat també a menors nivells de colesterol (402); ressaltant l'associació entre nivells baixos de colesterol i risc hemorràgic en l'AAC. El mecanisme exacte pel qual nivells baixos de colesterol poden promoure una HIC encara no es coneix. Tot i així, s'ha proposat que com el colesterol és un component essencial de les membranes cel·lulars, una disminució d'aquest podria portar a fragilitat cel·lular, facilitant la necrosi de cèl·lules endotelials i cèl·lules del múscul llis dels vasos (71,403,404). Aquesta debilitat vascular podria acabar portant a la ruptura del vas en forma de microsagnats, o HIC. Una altra explicació que s'ha proposat és l'efecte del colesterol en la coagulació (293). Concretament, el colesterol promou l'agregació plaquetària (405). Per tant, s'ha suggerit que nivells baixos de colesterol podrien disminuir la capacitat d'agregació plaquetària, endarrerint-la i causant una expansió de l'hematoma major amb un pitjor pronòstic clínic.

En sentit contrari, estudis previs han descrit la hipercolesterolèmia i una dieta rica en colesterol com a factors de risc per la MA (280,282); i fins i tot s'ha suggerit que l'administració d'estatines, que disminueixen els nivells lipídics perifèrics, podrien arribar a disminuir el risc de patir MA tot i que no hi ha dades suficients (283). De fet, els nivells de colesterol en MA s'han estudiat

molt i es creu que nivells alts de colesterol LDL (279) i de colesterol total (406) són un factor de risc per desenvolupar MA. Tot i així, els nostres resultats no han mostrat canvis en els nivells de colesterol en els pacients amb MA en comparació als controls. De fet, un meta-anàlisi va mostrar com nivells alts de colesterol en l'edat adulta són un factor de risc per patir MA amb un inici més primerenc; però que nivells alts en edats avançades no estan relacionats amb la MA (406), fet que podria explicar els nostres resultats. Els mecanismes pels quals el colesterol pot promoure la MA encara no són coneguts, però s'ha proposat que poden estar associats amb l'arterioesclerosi causant una afectació vascular i s'ha observat que promou l'acumulació d'A β en models animals (406,407).

2.2 Distribució d'apolipoproteïnes en la β -amiloïdosi cerebral

A nivell d'apolipoproteïnes plasmàtiques, el resultat més destacat de l'estudi 2 va ser observar menors nivells d'apolipoproteïna-II (ApoA-II) en mostres de pacients amb AAC respecte la resta de cohorts estudiades. L'ApoA-II és la segona apolipoproteïna més abundant en les HDL i està associada a diversos processos patològics com la hiperlipèmia (408). No hi ha altres estudis sobre els nivells d'aquesta apolipoproteïna en un context d'HIC o AAC. Tot i així, un estudi poblacional relacionava menors nivells d'ApoA-II amb un major risc de deteriorament cognitiu (409), i recentment s'ha publicat un nou article on es descriuen menors nivells d'ApoA-II en cohorts amb deteriorament cognitiu i MA (410). En sentit contrari, un altre estudi va descriure una associació entre majors nivells d'ApoA-II amb la progressió a MA en una població amb deteriorament cognitiu (411). Més estudis sobre ApoA-II en la β -amiloïdosi cerebral segueixen sent necessaris per entendre el seu rol en aquest procés patològic. Cal remarcar que, en el nostre estudi, els pacients amb MA no van presentar cap canvi significatiu respecte als controls pel que fa als nivells totals d'apolipoproteïnes en plasma.

Pel que fa a la distribució de les apolipoproteïnes en lipoproteïnes, vam observar una redistribució de l'apolipoproteïna C-III (ApoC-III) de les HDL cap a les VLDL en els pacients amb AAC. En més detall, els pacients amb AAC-HIC presentaven menors nivells d'ApoC-III a les HDL i majors nivells d'ApoC-III a les VLDL. En aquest sentit, també vam observar una tendència estadística de menors nivells d'ApoC-III a les HDL en pacients amb MA en comparació amb els controls; resultats en concordança amb un estudi previ

on associaven nivells alts d'ApoC-III a les HDL amb menor risc de demència (412). L'ApoC-III és el principal inhibidor de la LpL que degrada els triglicèrids de les VLDL (413), pel que nivells majors d'ApoC-III en aquesta lipoproteïna impliquen menys degradació de triglicèrids i per tant, VLDL de mida més gran, les quals es podrien relacionar amb desordres cardiometabòlics (414). Al fer la ràtio ApoE/ApoC-III en les HDL, aquesta resultava ser major en pacients amb AAC-HIC que en controls i pacients amb MA. Apart de la composició d'apolipoproteïnes, les HDL dels pacients amb AAC-HIC presentaven majors nivells de colesterol total i esterificat que els controls i els pacients amb MA; indicant HDLs més madures. En aquest sentit, HDL més madures, amb més ApoE i menys ApoC-III, es consideren ateroprotectors a nivell cardiovascular (324,415,416). Aquests resultats van lligats amb els resultats discutits prèviament que fan referència als nivells de colesterol, on observàvem que els pacients amb HIC-AAC presentaven un perfil ateroprotector. Així doncs, suggerim que aquest perfil ateroprotector lligat a l'AAC-HIC podria ser una resposta protectora davant el dany cerebrovascular, ja que per exemple, s'ha descrit que HDL enriquides amb ApoE poden disminuir l'AAC en un model in vitro (392). Per altra banda, aquests resultats seguirien la línia dels obtinguts a l'estudi anterior, on associàvem menors nivells d'ApoE a les HDL a marcadors radiològics de l'AAC.

Pel que fa als nivells d'ApoJ, no vam observar diferències a nivell plasmàtic entre els diferents grups estudiats. En aquest sentit, els resultats publicats fins a dia d'avui sobre els nivells plasmàtics d'ApoJ son divergents, amb estudis que han trobat nivells elevats en pacients amb MA (340,341) i HIC associada a l'AAC (156,340,341), però altres on no han trobat aquestes diferències (343,412). A l'ajustar pel genotip d'ApoE, vam identificar un augment de la quantitat d'ApoJ en LDL dels pacients amb MA, suggerint una redistribució d'aquesta lipoproteïna en la MA. Prèviament s'ha proposat que l'ApoJ lipidada té una major afinitat per megalina, un dels receptors implicat en l'aclariment d'A β (417). A més, l'augment d'ApoJ a les LDL el veiem en pacients amb MA en comparació amb pacients amb HIC-AAC; per tant, l'augment d'ApoJ en les LDL es podria interpretar com una resposta protectora en termes d'aclariment d'A β parenquimatós.

2.3 Propietats arterioescleròtiques en β -amiloïdosi cerebral

Seguidament vam estudiar les propietats arterioescleròtiques en un context cardiovascular, concretament la mida i les funcions relacionades amb l'oxidació de les

lipoproteïnes en les 3 cohorts. Vam observar una menor mida de les LDL en la cohort de MA en comparació amb pacients amb HIC-AAC. Cal assenyalar que LDL petites s'han associat prèviament amb processos inflamatoris i cardiovasculars (418). També vam observar menys activitat de Lp-PLA₂ en les HDL de pacients amb MA que en la cohort HIC-AAC; factor que podria implicar un deteriorament de la funció anti-inflamatòria de les HDL. Aquests resultats són complexos i difícils d'interpretar en un context de β -amiloïdosi cerebral però podrien ser el resultat d'un mal manteniment de l'estat anti-inflamatori en sang, lligat al concepte de la inflamació com un mecanisme central en el desenvolupament de la MA (419). Aquests resultats podrien implicar una pitjor regulació del sistema anti-inflamatori en la MA que en l'AAC, tot i que s'haurien de validar en altres cohorts i analitzar altres marcadors inflamatoris amb més profunditat.

2.4 Limitacions de l'estudi i potencial del perfil lipídic com a biomarcador

Els marcadors més específics que hem observat en aquest estudi són uns nivells disminuïts d'ApoA-II en plasma i una ràtio elevada d'ApoE/ApoC-III a les HDL de pacients amb HIC-AAC. Tot i ser potencials biomarcadors per l'AAC simptomàtica, es requereixen més estudis confirmant aquests resultats en estudis prospectius utilitzant cohorts més amples per tal de poder determinar el seu possible valor diagnòstic. A més, en un futur, seria molt interessant avaluar els nivells d'A β en les diferents poblacions de lipoproteïnes per poder entendre millor el rol d'aquestes en l'aclariment d'A β cerebral. En aquest estudi vam intentar portar a terme aquest tipus d'anàlisi, però les concentracions d'A β van resultar ser massa petites; requerint l'ús de tècniques de detecció amb millor sensibilitat.

Cal tenir en compte que aquest estudi presenta diferents limitacions. Apart de tenir una mostra petita, el fet que la cohort amb AAC hagi patit una HIC pot afectar els resultats. És a dir, podria ser que els resultats obtinguts estiguessin relacionats amb mecanismes associats al procés de la ruptura d'un vas cerebral, però no amb el dipòsit β -amiloide vascular, ja que un perfil lipídic ateroprotector també s'ha descrit en cohorts amb HIC no lobars (71,290,401). Un estudi comparant aquests resultats amb pacients que han patit una HIC d'etiologia diferent a l'AAC segueix sent necessari per poder validar els resultats obtinguts. A més, hi ha un gran solapament entre les dues malalties estudiades, l'AAC i la MA. De fet, estudis histopatològics han descrit que un gran percentatge de pacients amb MA presenten acumulació d'A β cerebrovascular, tot i que només un 25% d'aquests

presenten AAC avançada (420). El fet que en el nostre estudi es comparessin cohorts amb MA i AAC comporta una limitació intrínseca ja que podria ser que els pacients amb MA també presentin AAC i/o viceversa. Per tal de limitar aquest solapament entre les dues cohorts, es van seleccionar pacients amb MA que no haguessin patit cap HIC; i pacients d'AAC que no presentessin símptomes de demència. Una altra limitació de l'estudi és que no va ser possible avaluar la presència de marcadors radiològics associats amb l'AAC en la cohort de MA ja que no disposàvem d'informació radiològica. Tot i així, els resultats de l'estudi són clars i es va obtenir un perfil lipídic específic dels pacients amb AAC que havien patit una HIC. Considerem que aquest estudi aporta informació nova per entendre la rellevància del metabolisme lipídic en la β -amiloïdosi cerebral, que podria ajudar al futur maneig del tractament d'aquestes patologies, sobretot en relació a l'administració de medicaments que disminueixen els nivells de colesterol en sang.

3. Potencial terapèutic de rhApoJ

Seguidament, vam realitzar un estudi pre-clínic per determinar l'efecte de la proteïna ApoJ humana administrada perifèricament en el model in vivo de β -amiloïdosi cerebral APP23 (estudi 3). Com hem comentat, l'ApoJ és una proteïna multifuncional (amb activitat xaperona) implicada en l'agregació i aclariment d'A β però també en altres processos com el metabolisme lipídic i neuroinflamació (347,351). Degut a l'activitat xaperona d'ApoJ, en el nostre grup, vam estudiar el paper d'ApoJ com a potencial tractament per la β -amiloïdosi cerebral a nivell experimental. La hipòtesi de partida era que un increment circulat d'ApoJ podria desplaçar l'equilibri d'A β entre la perifèria i el cervell, reduint-ne els dipòsits vasculars i parenquimatosos. Concretament, vam avaluar l'efecte d'una administració subcrònica de rhApoJ en ratolins transgènics de la línia APP23 de 15 mesos d'edat, observant una reducció dels nivells d'A β insolubles intracerebrals, així com una disminució de la neurodegeneració (359). De totes maneres, l'impacte del tractament en la condició cerebrovascular no es va avaluar. Per això, en el present estudi, l'objectiu principal era estudiar l'impacte de la funció cerebrovascular, analitzant la presència de microhemorràgies cerebrals per RMN. El model seleccionat, un cop més, va ser la línia de ratolins APP23, ja que presenten acumulació d'A β en vasos cerebrals, així com microsagnats espontanis

associats a l'AAC en edats avançades (247,248,252). Aquest estudi es va dur a terme tractant ratolins de 20 mesos d'edat de manera crònica, durant 13 setmanes, amb la mateixa dosi que en l'estudi previ.

3.1 Efecte de rhApoJ en la presència de lesions hemorràgiques i els nivells d'A β cerebrals

El resultat principal del nostre estudi va ser demostrar que augmentar els nivells perifèrics d'ApoJ a través del tractament crònic amb rhApoJ tenia un impacte en punts clínicament rellevants, concretament, en la càrrega hemorràgica.

En més detall, vam observar que els ratolins APP23 tractats amb rhApoJ tenien una reducció del número de lesions corticals detectades per RMN, tant microhemorràgies com hemorràgies més grans. El fet que aquesta reducció es donés a zones corticals i no en zones cerebrals profundes suggereix un efecte específic a les artèries més superficials, més típicament afectades per l'AAC.

En l'estudi previ del grup (359) vam observar que el tractament amb rhApoJ en ratolins APP23 de 15 mesos d'edat reduïa els nivells d'A β parenquimatós insoluble així com la mida de les plaques neurítiques i el número de vasos sanguinis amb acumulació d'A β . També vam observar una reducció dels nivells solubles d'A β ₄₀ tot i que no de manera significativa. De fet, en altres estudis també han observat que alteracions genètiques a CLU o l'administració d'ApoJ o pèptids mimètics a diferents models animals és capaç de modular els nivells d'A β o la seva distribució cerebral (356–358,421), destacant una funció rellevant d'ApoJ en la regulació de l'agregació i aclariment d'A β . En l'estudi actual però, no vam observar diferències en els nivells d'A β fibril·lar entre tractaments. És a dir, els efectes observats a nivell de càrrega hemorràgica no podien ser explicats per la modulació dels nivells o distribució d'A β insoluble. Una possible explicació per la discordança entre el nostre estudi i els previs podria ser l'avançada edat dels ratolins utilitzats. En més detall, en aquest estudi, on els ratolins començaven a tractar-se als 20 mesos d'edat, ja hi ha una patologia associada a l'A β molt establerta i saturada, amb poques possibilitats de poder modular els nivells d'A β fibril·lar dipositada. Per altra banda, hagués estat interessant analitzar l'efecte del tractament en els nivells d'A β soluble cerebrals, que no vam poder dur a terme per falta d'homogenats cerebrals. L'A β soluble pot ser més fàcilment mobilitzada del parènquima a la vasculatura que l'A β fibril·lar, podent exacerbar l'acumulació d'aquesta a les parets arterials, agreujant l'AAC,

perjudicant l'aclariment d'A β i presentant també toxicitat (161,422). Ja que el tractament amb rhApoJ no va tenir cap efecte detectable pel que fa als nivells d'A β fibril·lar, podem especular que els efectes protectors del tractament amb rhApoJ, pel que fa a la càrrega hemorràgica, poden venir donats per una millor condició cerebrovascular, evitant l'aparició de microsagnats cerebrals. De fet, aquesta possible millora en la condició vascular podria resultar també en un mecanisme d'aclariment perifèric d'A β més eficient, explicant els resultats on es veu una disminució d'A β en ratolins més joves tractats amb rhApoJ. En aquest sentit, en el nostre estudi amb ratolins envellits, vam observar una correlació inversa entre el número de vasos positius d'A β i els dipòsits totals d'A β fibril·lar al còrtex dels ratolins tractats amb rhApoJ. Aquests resultats estarien alineats amb la idea d'una funció rellevant d'ApoJ en el procés d'aclariment d'A β (351), promovent una possible redistribució d'A β del parènquima a la vasculatura (354,423).

3.2 Efecte de rhApoJ en la micròglia i inflamació

A continuació, degut a l'associació descrita entre micròglia perivascular activa amb una major severitat d'AAC i disrupció de la BHE en cervells d'humans (52), vam estudiar l'estat inflamatori i la resposta immunològica després del tractament amb rhApoJ.

En l'estudi realitzat prèviament (359), havíem observat que el tractament amb rhApoJ augmentava els nivells de CD68 de la micròglia que rodejava les plaques neurítiques. I de fet, en un model *in vitro* vam demostrar que rhApoJ augmentava la captació d'A β per part de micròglia (359), tal i com s'havia descrit prèviament (424). De totes maneres, en l'estudi actual no vam veure canvis als nivells corticals de CD68 entre ratolins APP23 tractats amb rhApoJ o salí. Creiem que aquests resultats poden ser deguts, un cop més, a l'edat dels ratolins tractats en l'estudi actual, els quals presenten una major acumulació d'A β fibril·lar i una resposta de la micròglia molt activada de per sí. En aquest sentit, observem un augment significatiu dels nivells corticals tant de Iba1 com de CD68 en els ratolins APP23 respecte els WT, confirmant nivells més elevats de micròglia i més activada en ratolins envellits amb un alt contingut d'A β cerebral. Per altra banda, també cal mencionar que en l'estudi actual, la quantificació dels nivells de CD68 només s'ha pogut realitzar a partir de tècniques immunohistoquímiques ja que no teníem disponibilitat d'homogenats cerebrals. Per tant, no podem descartar la possibilitat de detectar més diferències entre grups de tractament utilitzant tècniques més sensibles.

De fet, cal remarcar que no vam detectar la presència de proteïna rhApoJ humana a l'interior del cervell, però sí en sang i en alguns vasos leptomeníngics en un grup de ratolins que havien estat eutanasiats només 30 minuts després d'una dosi de tractament amb rhApoJ, tal i com havíem descrit prèviament (359). Aquest fet suggereix que el tractament amb rhApoJ actua a través de la perifèria i no per acció directa al parènquima cerebral. Per aquest motiu vam decidir avaluar diferents marcadors inflamatoris plasmàtics. Vam observar que els ratolins que havien estat eutanasiats poc després de l'administració de rhApoJ (30 minuts) presentaven nivells elevats de Gro α , també coneguda com CXCL1 (de l'anglès, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) i KC; i de MIP-1 α (de l'anglès, *macrophage inflammatory protein-1 alpha*) també anomenada CCL3 (de l'anglès, *chemokine (C-C motif) ligand 3*) en comparació amb els APP23 tractats amb salí. S'ha proposat que nivells elevats de MIP-1 α i Gro α poden promoure migració de monòcits al cervell en un context de MA on hi ha acumulació d'A β (425,426). En aquest sentit, els monòcits tenen un paper molt important després d'una lesió hemorràgica cerebral en un intent de reabsorbir l'hematoma i promoure la curació del teixit, tot i que també podrien arribar a promoure la inflamació (427). A més, cal destacar que el tractament no va induir una resposta pro-inflamatòria sistèmica ja que no va tenir efecte en els nivells de quimiocines pro-inflamatòries com IL-1 β i IL-17A.

3.3 Efecte de rhApoJ en els nivells plasmàtics de MMP-12

Per altra banda, altres marcadors plasmàtics estudiats van ser les metal·loproteïnases de matriu. En concret vam observar nivells reduïts de MMP-12 plasmàtica en els ratolins que havien rebut rhApoJ i que havien estat eutanasiats poc després de l'administració, comparat amb els ratolins tractats amb salí. Apart, els nivells de MMP-12 es van associar al número d'hemorràgies corticals grans i al volum de les lesions hemorràgiques corticals en els ratolins APP23 que havien rebut un tractament crònic. En aquest sentit, no hi ha altres estudis descrivint l'efecte de l'ApoJ sobre MMP-12, però sí que s'ha descrit que pot reduir els nivells i activitat d'altres proteïnes de la família de MMP, com la MMP-9, MMP-3 i MMP-7 (428–430). Cal mencionar que altres MMP s'han associat amb l'AAC i s'ha proposat que podrien contribuir al dany vascular promovent hemorràgies cerebrals (12,338,431,432). Prèviament s'ha descrit una associació entre MMP-12 i dany de la BHE en models animals (433,434). Més en concret, s'ha descrit que MMP-12 indueix dany a la BHE després d'una isquèmia cerebral i que els seus nivells estan elevats i tenen un impacte negatiu en la funció sensomotora després d'una HIC en models de

rosegadors (433–435). Tenint en compte que en l'AAC hi ha una disrupció de la BHE (81–83) i que aquesta disrupció podria resultar en el desenvolupament de microsagnats cerebrals (84–86), proposem que l'efecte de la rhApoJ en la cerebrovasculatura podria estar associat a la seva capacitat de reduir els nivells circulants de MMP-12. A més, la MMP-12 està també implicada en processos patològics de moltes malalties inflamatòries i s'ha descrit que les cèl·lules de la micròglia augmenten la secreció de MMP-12 al ser tractades amb $A\beta_{1-42}$ *in vitro* (436,437). Finalment, també s'ha proposat la MMP-12 com una diana terapèutica prometedora per diferents malalties neurològiques, incloent l'HIC (437).

Per tal de confirmar el potencial paper de la MMP-12 en l'HIC, vam analitzar aquesta molècula en una cohort de pacients que havia patit una hemorràgia intracerebral aguda. Tot i que els nivells de MMP-12 en plasma no es van associar a la localització de l'HIC i no van resultar diferents respecte els controls, en el subgrup de pacients amb una HIC lobar, la qual se sol associar típicament a una etiologia d'AAC, vam trobar diferents associacions interessants. En primer lloc, els resultats obtinguts van mostrar una correlació significativa entre els nivells plasmàtics de MMP-12 i el volum d'HIC, variable que s'ha associat a una major expansió de l'hematoma (62). A més, també vam observar una associació entre els nivells de MMP-12 en plasma i una forma més irregular de l'HIC, un paràmetre de neuroimatge també associat amb l'expansió de l'hematoma (77). Aquests resultats indicarien una associació entre els nivells de MMP-12 plasmàtics i marcadors associats a una major expansió de l'hematoma i per tant, a un pitjor pronòstic.

Per concloure, proposem que la reducció dels nivells plasmàtics de MMP-12 deguda al tractament perifèric amb rhApoJ podria modular la fragilitat de la BHE, evitant dany d'aquesta i reduint el número de lesions hemorràgiques en un context de β -amiloïdosi cerebral. Tot i així, no podem descartar que l'ApoJ circulant actuï sobre la cerebrovasculatura per diferents mecanismes paral·lelament. Per exemple, un estudi molt recent suggereix que ApoJ promou la capacitat d'efluxió de colesterol de les HDL al LCR, amb menors nivells associant-se a la MA (345). En aquest sentit, seria interessant portar a terme un estudi més profund sobre el possible efecte d'ApoJ en el metabolisme lipídic en els nostres models experimentals de β -amiloïdosi cerebral.

3.4 Limitacions i perspectives de futur per l'ApoJ i la MMP-12

El nostre estudi presenta diferents limitacions, entre elles, la utilització d'un nombre limitat d'animals en els grups de tractament degut a la dificultat d'obtenir una cohort de ratolins envellits de 23 mesos, especialment ratolins APP23 que tenen més mortalitat associada (258). Apart, tots els ratolins utilitzats van ser femelles, ja que prèviament havíem observat que les femelles APP23 presenten més acumulació d'A β que els mascles, assumint una patologia relacionada amb l'AAC més severa en femelles. Per altra banda, no es va poder realitzar una RMN basal als ratolins pel risc de mortalitat associat a temps llargs d'anestèsia en animals envellits. Finalment, una altra limitació de l'estudi va ser haver de realitzar la RMN *ex vivo* degut a que la realització d'aquests experiments va coincidir amb el període de confinament causat per la crisi de la COVID-19, fet que va impedir l'obtenció d'homogenats de cervells del grup de ratolins que havien rebut el tractament crònic. És per això que més estudis augmentant la mostra, i/o estudiant l'efecte d'ApoJ en lesions hemorràgiques en mascles i en altres models d'AAC serien molt interessants per confirmar els nostres resultats. Pel que fa a l'estudi realitzat utilitzant mostres de plasma humà, no va ser possible obtenir informació de RMN de tots els pacients, pel que ens vam haver de limitar a informació radiològica obtinguda del TC basal. De totes maneres, considerem que el nostre estudi contribueix enormement al coneixement sobre l'aparició d'hemorràgies cerebrals i el paper de l'ApoJ i la MMP-12 en l'AAC, sent potencials dianes terapèutiques i proposem que tractaments basats en la sobrerregulació d'ApoJ ofereixen una oportunitat terapèutica no invasiva per millorar la patologia cerebrovascular associada amb l'acumulació cerebral d'A β .

Conclusions



Conclusions

- 1) Diferents variants genètiques prèviament associades amb la MA, en concret SNPs en els gens ABCA7, BIN1, CD2AP, CLU, CR1, EPHA1 i TREML2, s'associen a diferents marcadors radiològics característics de l'AAC en una cohort amb HIC lobar i sospita clínica d'AAC. En concret, els SNPs d'ABCA7 (rs3764650), CLU (rs9331896 i rs933188), EPHA1 (rs11767557), i TREML2 (rs3747742) s'associen a l'escala global de severitat de malaltia de petit vas associada a l'AAC (CAA-SVDB).
- 2) Variants genètiques de CLU i APOE, protectores per la MA, s'associen a nivells més alts d'ApoJ en HDL i ApoE en LDL en una cohort amb HIC lobar i sospita clínica d'AAC. A més, menors nivells d'ApoJ i ApoE en HDL i LDL s'associen amb la presència i el grau de diversos marcadors radiològics característics de l'AAC. Notablement, menors nivells d'ApoJ en LDL i d'ApoE en plasma i HDL s'associen a la presència i un major grau d'EPVD-CSO. Proposem que nivells elevats d'ApoJ i ApoE a les HDL i LDL podrien promoure una resposta protectora en l'AAC.
- 3) Pacients amb HIC associada a l'AAC tenen un perfil lipídic alterat respecte una població control i pacients amb MA. Concretament, els pacients amb una HIC associada a AAC presenten un perfil lipídic ateroprotector amb menys nivells de colesterol total i en les LDL, menors nivells d'ApoA-II plasmàtics i una major ràtio d'ApoE/ApoC-III a les HDL. En canvi, en el nostre estudi, els pacients amb MA no mostren cap alteració en el perfil lipídic perifèric ni en el contingut de les lipoproteïnes respecte els controls.
- 4) El tractament perifèric amb proteïna recombinant ApoJ humana redueix el número de microhemorràgies i hemorràgies grans al còrtex, associades a l'AAC, en un model *in vivo* de β -amiloïdosi cerebral, sense afectar nivells d'A β insoluble cerebrals. A més, el tractament promou un augment dels nivells plasmàtics de Gro- α i MIP-1 α i una reducció en els de la metal·loproteïnasa de matriu (MMP)-12. Aquests resultats suggereixen que tractaments basats en un increment d'ApoJ circulant ofereixen una oportunitat terapèutica no invasiva per la β -amiloïdosi cerebral.

- 5) En una cohort de pacients amb HIC aguda, els nivells plasmàtics de MMP-12 s'associen al volum i a una forma irregular de l'hemorràgia en pacients que han patit una HIC lobar, resultats que situen la MMP-12 com una molècula amb potencial rellevància en l'HIC i l'AAC

Bibliografia



Bibliografia

1. Merlini G, Bellotti V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(6).
2. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(1):30–42.
3. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. Vol. 38, *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group; 2017. p. 1205–35.
4. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011 Jul 21;34:185–204.
5. Zhao J, Liu X, Xia W, Zhang Y, Wang C. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. Vol. 13, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
6. Wilkins HM, Swerdlow RH. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. Vol. 133, *Brain Research Bulletin*. Elsevier Inc.; 2017. p. 71–9.
7. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke*. 2015;17(1):17–30.
8. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2015 Aug 8;11(8):457–70.
9. Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: Recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(2):124–37.
10. Schreiner TG, Popescu BO. Amyloid beta dynamics in biological fluids—therapeutic impact. *J Clin Med*. 2021 Dec 1;10(24).
11. Wang S, Wang R, Chen L, Bennett DA, Dickson DW, Wang DS. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem*. 2010;115(1):47–57.
12. Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P, Domingues-Montanari S, Boada C, Penalba A, et al. MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Brain Pathology*. 2012 Mar;22(2):133–41.
13. Hernandez-Guillamon M, Mawhirt S, Blais S, Montaner J, Neubert TA, Rostagno A, et al. Sequential amyloid- β degradation by the matrix

- metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Jun 12;290(24):15078–91.
14. Fiala M, Cribbs DH, Rosenthal M, Bernard G. Phagocytosis of Amyloid- β and Inflammation: Two Faces of Innate Immunity in Alzheimer's Disease 1. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2007;11:457–63.
 15. Thériault P, Elali A, Rivest S. The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2015 Apr 15;7(1).
 16. Wyatt-Johnson SK, Brutkiewicz RR. The Complexity of Microglial Interactions With Innate and Adaptive Immune Cells in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2020 Nov 19;12.
 17. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010 Jan;37(1):13–25.
 18. Yamada K, Hashimoto T, Yabuki C, Nagae Y, Tachikawa M, Strickland DK, et al. The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid β peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Dec 12;283(50):34554–62.
 19. Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid β -peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid β -peptide. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(30):18644–9.
 20. Chai AB, Leung GKF, Callaghan R, Gelissen IC. P-glycoprotein: a role in the export of amyloid- β in Alzheimer's disease? *FEBS Journal*. 2020 Feb 1;287(4):612–25.
 21. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, Paul SM, et al. Deletion of Abca1 increases A β deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Dec 30;280(52):43236–42.
 22. Mackic JB, Stins M, Gordon McComb J, Calero M, Ghiso J, Sik Kim K, et al. Human Blood-Brain Barrier Receptors for Alzheimer's Amyloid-1-40 Asymmetrical Binding, Endocytosis, and Transcytosis at the Apical Side of Brain Microvascular Endothelial Cell Monolayer. *J Clin Invest*. 1998;102(4):734–43.
 23. Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, et al. Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 May 1;36(4):483–95.
 24. Demattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, Dell MAO, Taylor JW, et al. ApoE and Clusterin Cooperatively Suppress A β Levels and Deposition. 2004;41:193–202.

25. Zhao L, Tannenbaum A, Bakker ENTP, Benveniste H. Physiology of Glymphatic Solute Transport and Waste Clearance from the Brain. *Physiology*. 2022 Nov 1;37(6):0.
26. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012 Aug 15;4(147).
27. Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, Page AM, Nicoll JAR, Perry VH, et al. Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: Significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008 Apr;34(2):131–44.
28. Carare RO, Aldea R, Agarwal N, Bacskai BJ, Bechman I, Boche D, et al. Clearance of interstitial fluid (ISF) and CSF (CLIC) group—part of Vascular Professional Interest Area (PIA): Cerebrovascular disease and the failure of elimination of Amyloid- β from the brain and retina with age and Alzheimer's disease-Opportunities for Therapy. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*. 2020;12(1).
29. Thal DR, Ghebremedhin E, Yamaguchi H, del Tredici K, Braak H. Two Types of Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(3).
30. Asgari M, de Zélécourt D, Kurtcuoglu V. Glymphatic solute transport does not require bulk flow. *Sci Rep*. 2016 Dec 8;6.
31. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Froesch MP, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2017;140(7):1829–50.
32. Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant ; Gordon, Rostagno A, Ghiso J, et al. Sporadic and Familial Cerebral Amyloid Angiopathies. *Brain Pathol*. 2002;12:343–57.
33. Biffi A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: A systematic review. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*. 2011;7(1):1–9.
34. Charidimou A, Imaizumi T, Moulin S, Biffi A, Samarasekera N, Yakushiji Y, et al. Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology*. 2017;89(8):820–9.
35. Li L, Poon MTC, Samarasekera NE, Moullaali MRCP TJ, Rodrigues MA, M Loan MRCS JJ, et al. Risks of recurrent stroke and all serious vascular events after spontaneous intracerebral haemorrhage: pooled analyses of two population-based studies. *Articles Lancet Neurol*. 2021;20:437–84.
36. Pinho J, Araújo JM, Costa AS, Silva F, Francisco A, Quintas-Neves M, et al. Intracerebral Hemorrhage Recurrence in Patients with and without Cerebral Amyloid Angiopathy. *Cerebrovasc Dis Extra*. 2021 Jan 1;11(1):15–21.

37. Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, Wilson RS, Bennett DA, Schneider JA. Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Cognitive Domains in Older Persons. *Ann Neurol*. 2011;69(2):320–7.
38. Smith EE, Charidimou A, Ayata C, Werring DJ, Greenberg SM. Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Transient Focal Neurologic Episodes. *Neurology*. 2021;97(5):231–8.
39. Greenberg SM, Eng JA, Ning MM, Smith EE, Rosand J. Hemorrhage burden predicts recurrent intracerebral hemorrhage after lobar hemorrhage. *Stroke*. 2004;35(6):1415–20.
40. Banerjee G, Wilson D, Ambler G, Osei-Bonsu Appiah K, Shakeshaft C, Lunawat S, et al. Cognitive Impairment Before Intracerebral Hemorrhage Is Associated With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke*. 2018;49:40–5.
41. Boyle PA, Yu L, Nag S, Leurgans S, Wilson RS, Bennett DA, et al. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology*. 2015;85:1930–6.
42. Chwalisz BK. Cerebral amyloid angiopathy and related inflammatory disorders. *J Neurol Sci*. 2021 May 15;424.
43. Vinters H. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1987;18(2):311–24.
44. van Veluw SJ, Arfanakis K, Schneider JA. Neuropathology of Vascular Brain Health: Insights from Ex Vivo Magnetic Resonance Imaging-Histopathology Studies in Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke*. 2022 Feb 1;53(2):404–15.
45. Jäkel L, de Kort AM, Klijn CJM, Schreuder FHBM, Verbeek MM. Prevalence of cerebral amyloid angiopathy: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's and Dementia*. 2022 Jan 1;18(1):10–28.
46. Thal DR, Papassotiropoulos A, Saido TC, Griffin WST, Mrak RE, Kölsch H, et al. Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE ϵ 4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2010 Aug;120(2):169–83.
47. Thal RD, Ghebremedhin E, Orantes M, Wiestler OD. Vascular Pathology in Alzheimer Disease: Correlation of Cerebral Amyloid Angiopathy and Arteriosclerosis/Lipohyalinosis with Cognitive Decline. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(12).
48. Paul Vonsattel JG, Myers RH, Tessa Hedley-Whyte E, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP. Cerebral Amyloid Angiopathy Without and with Cerebral Hemorrhages: A Comparative Histological Study. *American Neurological Association* . 1991;30:637–49.
49. Greenberg SM, Vonsattel JPG. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke*. 1997;28(7):1418–22.

50. Attems J, Lauda F, Jellinger KA. Unexpectedly low prevalence of intracerebral hemorrhages in sporadic cerebral amyloid angiopathy: An autopsy study. *J Neurol*. 2008 Jan;255(1):70–6.
51. Love S, Chalmers K, IP, EM, AJ, JK, Yamada M, McCarron M, Minett T, Matthews F, et al. Development, appraisal, validation and implementation of a consensus protocol for the assessment of cerebral amyloid angiopathy in post-mortem brain tissue. *Am J Neurodegener Dis*. 2014;3:19–32.
52. Kozberg MG, Yi I, Freeze WM, Auger CA, Scherlek AA, Greenberg SM, et al. Blood-brain barrier leakage and perivascular inflammation in cerebral amyloid angiopathy. *Brain Commun*. 2022;
53. Cortes-Canteli M, Paul J, Norris EH, Bronstein R, Ahn HJ, Zamolodchikov D, et al. Fibrinogen and β -Amyloid Association Alters Thrombosis and Fibrinolysis: A Possible Contributing Factor to Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2010 Jun;66(5):695–709.
54. Ziliotto N, Bernardi F, Piazza F. Hemostasis components in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*. 2021 Aug 1;42(8):3177–88.
55. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the boston criteria. *Neurology*. 2001;56(4):537–9.
56. Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese A, Dichgans M, et al. Prevalence of Superficial Siderosis in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neurology*. 2010;74:1346–50.
57. Charidimou A, Boulouis G, Frosch MP, Baron JC, Pasi M, Albuchoer JF, et al. The Boston criteria version 2.0 for cerebral amyloid angiopathy: a multicentre, retrospective, MRI-neuropathology diagnostic accuracy study. *Lancet Neurol*. 2022;21(8):714–25.
58. Rodrigues MA, Samarasekera N, Lerpiniere C, Humphreys C, McCarron MO, White PM, et al. The Edinburgh CT and genetic diagnostic criteria for lobar intracerebral haemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy: model development and diagnostic test accuracy study. *Lancet Neurol*. 2018 Mar 1;17(3):232–40.
59. Sembill JA, Knott M, Xu M, Roeder SS, Hagen M, Sprügel MI, et al. Simplified Edinburgh CT Criteria for Identification of Lobar Intracerebral Hemorrhage Associated With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neurology*. 2022 May 17;98(20):E1997–2004.
60. Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Inflammation*. 2010;92(4):463–77.

61. Godoy DA, Piñero GR, Koller P, Masotti L, Napoli M di. Steps to consider in the approach and management of critically ill patient with spontaneous intracerebral hemorrhage. *World J Crit Care Med.* 2015;4(3):213.
62. Al-Shahi Salman R, Frantziar J, Lee RJ, Lyden PD, Battey TWK, Ayres AM, et al. Absolute risk and predictors of the growth of acute spontaneous intracerebral haemorrhage: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol.* 2018 Oct 1;17(10):885–94.
63. Du X, Lin X, Wang C, Zhou K, Wei Y, Tian X. Endoscopic surgery versus craniotomy in the treatment of spontaneous intracerebral hematoma: a systematic review and meta-analysis. *Chin Neurosurg J.* 2022 Dec 1;8(1).
64. Hostettler IC, Seiffge DJ, Werring DJ. Intracerebral hemorrhage: An update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother.* 2019 Jul 3;19(7):679–94.
65. Swarup O, Barker JL, Watson R, Davis SM, Campbell BC v., Yassi N. Cerebral amyloid angiopathy: clinical presentations and management challenges in the Australian context. *Intern Med J.* 2023 Jan 13;
66. Wartenberg KE, Wang X, Muñoz-Venturelli P, Rabinstein AA, Lavados PM, Anderson CS, et al. Intensive Care Unit Admission for Patients in the INTERACT2 ICH Blood Pressure Treatment Trial: Characteristics, Predictors, and Outcomes. *Neurocrit Care.* 2017 Jun 1;26(3):371–8.
67. Anderson CS, Heeley E, Huang Y, Wang J, Stapf C, Delcourt C, et al. Rapid Blood-Pressure Lowering in Patients with Acute Intracerebral Hemorrhage. *New England Journal of Medicine.* 2013 Jun 20;368(25):2355–65.
68. Sibon I, Mazighi M, Smadja D. Decision-Making Process for the Management of Acute Stroke in Patients on Oral Anticoagulant: From Guidelines to Clinical Routine. *Front Neurol.* 2022 Jan 5;12.
69. Schreuder FH, van Dalen JW, M Klijn CJ, van Nieuwenhuizen KM, Zweedijk B, Algra A, et al. Apixaban versus no anticoagulation after anticoagulation-associated intracerebral haemorrhage in patients with atrial fibrillation in the Netherlands (APACHE-AF): a randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20:907–23.
70. Al-Shahi Salman R, Keerie C, Stephen J, Lewis S, Norrie J, Dennis MS, et al. Effects of oral anticoagulation for atrial fibrillation after spontaneous intracranial haemorrhage in the UK: a randomised, open-label, assessor-masked, pilot-phase, non-inferiority trial. *Lancet Neurol.* 2021 Oct 1;20(10):842–53.
71. Ma Y, Li Z, Chen L, Li X. Blood lipid levels , statin therapy and the risk of intracerebral hemorrhage. *Lipids Health Dis.* 2016;
72. Endres M, Nolte CH, Scheitz JF. Statin treatment in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2018;49(1):240–6.

73. Schlemm L, Braemswig TB, Boutitie F, Vynckier J, Jensen M, Galinovic I, et al. Cerebral Microbleeds and Treatment Effect of Intravenous Thrombolysis in Acute Stroke: An Analysis of the WAKE-UP Randomized Clinical Trial. *Neurology*. 2022 Jan 18;98(3):E302–14.
74. Weber SA, Patel RK, Lutsep HL. Cerebral amyloid angiopathy: diagnosis and potential therapies. *Expert Rev Neurother*. 2018 Jun 3;18(6):503–13.
75. Leurent C, Goodman JA, Zhang Y, He P, Polimeni JR, Gurol ME, et al. Immunotherapy with ponezumab for probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Apr 1;6(4):795–806.
76. Barras CD, Tress BM, Christensen S, MacGregor L, Collins M, Desmond PM, et al. Density and shape as CT predictors of intracerebral hemorrhage growth. *Stroke*. 2009 Apr 1;40(4):1325–31.
77. Boulouis G, Morotti A, Charidimou A, Dowlatshahi D, Goldstein JN. Noncontrast Computed Tomography Markers of Intracerebral Hemorrhage Expansion. *Stroke*. 2017;48:1120–5.
78. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol*. 2010;9(7):689–701.
79. Greenberg SM, Vernooij MW, Cordonnier C, Viswanathan A, Al-Shahi Salman R, Warach S, et al. Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation. *Lancet Neurol*. 2009 Feb;8(2):165–74.
80. Charidimou A, Krishnan A, Werring DJ, Rolf Jäger H. Cerebral microbleeds: A guide to detection and clinical relevance in different disease settings. *Neuroradiology*. 2013;55(6):655–74.
81. McAleese KE, Graham S, Dey M, Walker L, Erskine D, Johnson M, et al. Extravascular fibrinogen in the white matter of Alzheimer's disease and normal aged brains: implications for fibrinogen as a biomarker for Alzheimer's disease. *Brain Pathology*. 2019 May 1;29(3):414–24.
82. Parodi-Rullán RM, Javadov S, Fossati S. Dissecting the crosstalk between endothelial mitochondrial damage, vascular inflammation, and neurodegeneration in cerebral amyloid angiopathy and alzheimer's disease. *Cells*. 2021 Nov 1;10(11).
83. Situ M, Citalan-Madrid AF, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic A v. Transcriptomic Profile of Blood–Brain Barrier Remodeling in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Cell Neurosci*. 2022 Jun 22;16.
84. Sumbria RK, Grigoryan MM, Vasilevko V, Paganini-Hill A, Kilday K, Kim R, et al. Aging exacerbates development of cerebral microbleeds in a mouse model. *J Neuroinflammation*. 2018 Mar 6;15(1).

85. Schreiber S, Bueche CZ, Garz C, Braun H. Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? - New insights from a rat model. *Exp Transl Stroke Med.* 2013 Mar 14;5(1).
86. van Nieuwenhuizen KM, Hendrikse J, Klijn CJM. New microbleed after blood-brain barrier leakage in intracerebral haemorrhage. *BMJ Case Rep.* 2017;bcr2016218794.
87. Wang HL, Zhang CL, Qiu YM, Chen AQ, Li YN, Hu B. Dysfunction of the Blood-brain Barrier in Cerebral Microbleeds: from Bedside to Bench. *Aging Dis.* 2021 Dec 1;12(8):1898–919.
88. Boulouis G, Charidimou A, Greenberg SM. Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy: Pathophysiology, Neuroimaging Features, and Clinical Implications. *Semin Neurol.* 2016;36(3):233–43.
89. Wu R, Feng C, Zhao Y, Jin AP, Fang M, Liu X. A meta-analysis of association between cerebral microbleeds and cognitive impairment. *Medical Science Monitor.* 2014 Nov 7;20:2189–98.
90. Poels MMF, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman PA, Niessen WJ, Krestin GP, et al. Cerebral microbleeds are associated with worse cognitive function. *Neurology.* 2012;78:326–33.
91. Cordonnier C, van der Flier ; W M, Sluimer ; J D, Leys ; D, Barkhof ; F, Scheltens P. Prevalence and severity of microbleeds in a memory clinic setting. *Neurology.* 2006;66:1356–60.
92. Caunca MR, de Leon-Benedetti A, Latour L, Leigh R, Wright CB. Neuroimaging of cerebral small vessel disease and age-related cognitive changes. *Front Aging Neurosci.* 2019;11.
93. Charidimou A, Peeters A, Jager HR, Fox Z, Vandermeeren Y, Laloux P, et al. Cortical superficial siderosis and bleeding risk in cerebral amyloid angiopathy: Multicentre MRI cohort study. *International Journal of Stroke.* 2013;8:50.
94. Charidimou A, Perosa V, Frosch MP, Scherlek AA, Greenberg SM, van Veluw SJ. Neuropathological correlates of cortical superficial siderosis in cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* 2020;143(11):3343–51.
95. Charidimou A, Boulouis G, Roongpiboonsopit D, Xiong L, Pasi M, Schwab KM, et al. Cortical superficial siderosis and recurrent intracerebral hemorrhage risk in cerebral amyloid angiopathy: Large prospective cohort and preliminary meta-analysis. *International Journal of Stroke.* 2019 Oct 1;14(7):723–33.
96. Boulouis G, Charidimou A, Pasi M, Roongpiboonsopit D, Xiong L, Auriel E, et al. Hemorrhage Recurrence Risk Factors In Cerebral Amyloid Angiopathy: Comparative Analysis of the Overall Small Vessel Disease Severity score versus Individual Neuroimaging markers. *J Neurol Sci.* 2017;380:64–7.

97. Charidimou A, Linn J, Vernooij MW, Opherk C, Akoudad S, Baron JC, et al. Cortical superficial siderosis: Detection and clinical significance in cerebral amyloid angiopathy and related conditions. *Brain*. 2015 Aug 1;138(8):2126–39.
98. Gurol ME, Viswanathan A, Gidicsin C, Ramirez-martinez S, Dumas A, Ayres AM, et al. Cerebral Amyloid Angiopathy Burden Associated with Leukoaraiosis: a PET/MRI Study. 2014;73(4):529–36.
99. Smith EE, Gurol ME, Eng JA, Engel CR, Nguyen TN, Rosand J, et al. White matter lesions, cognition, and recurrent hemorrhage in lobar intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2004;63(9):1606–12.
100. Benedictus MR, van Harten AC, Leeuwis AE, Koene T, Scheltens P, Barkhof F, et al. White Matter Hyperintensities Relate to Clinical Progression in Subjective Cognitive Decline. *Stroke*. 2015;46(9):2661–4.
101. Wardlaw JM, Valdés Hernández MC, Muñoz-Maniega S. What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(6):001140.
102. Prins ND, Scheltens P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: An update. *Nat Rev Neurol*. 2015 Mar 14;11(3):157–65.
103. Doubal FN, MacLulich AMJ, Ferguson KJ, Dennis MS, Wardlaw JM. Enlarged Perivascular Spaces on MRI Are a Feature of Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke*. 2010;41(3):450–4.
104. Charidimou A, Meegahage R, Fox Z, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, et al. Enlarged perivascular spaces as a marker of underlying arteriopathy in intracerebral haemorrhage: A multicentre MRI cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(6):624–9.
105. Banerjee G, Hj K, Fox Z, Wilson D, Charidimou A, Hk N, et al. MRI-visible perivascular space locations distinguishes Alzheimer’s disease from subcortical vascular cognitive impairment independently of amyloid burden CORE View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk provided by UCL Discovery. *Brain*. 2017;140:1107–16.
106. Roher AE, Kuo YM, Esh C, Knebel C, Weiss N, Kalback W, et al. Cortical and leptomeningeal cerebrovascular amyloid and white matter pathology in Alzheimer’s disease. *Molecular Medicine*. 2003;9(3–4):112–22.
107. van Veluw SJ, Biessels GJ, Bouvy WH, Spliet WG, Zwanenburg JJ, Luijten PR, et al. Cerebral amyloid angiopathy severity is linked to dilation of juxtacortical perivascular spaces. *JCBFM*. 2016;36(3):576–80.
108. Perosa V, Oltmer J, Munting LP, Freeze WM, Auger CA, Scherlek AA, et al. Perivascular space dilation is associated with vascular amyloid- β accumulation in the overlying cortex. *Acta Neuropathol*. 2022 Mar 1;143(3):331–48.

109. Hawkes CA, Härtig W, Kacza J, Schliebs R, Weller RO, Nicoll JA, et al. Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 2011 Apr;121(4):431–43.
110. Arbel-Ornath M, Hudry E, Eikermann-Haerter K, Hou S, Gregory JL, Zhao L, et al. Interstitial fluid drainage is impaired in ischemic stroke and Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathol.* 2013;126(3):353–64.
111. Charidimou A, Jaunmuktane Z, Baron JC, Burnell M, Varlet P, Peeters A, et al. White matter perivascular spaces: An MRI marker in pathology-proven cerebral amyloid angiopathy? *Neurology.* 2014;82(1):57–62.
112. Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Reijmer YD, Oliveira-Filho J, Lauer A, Roongpiboonsopit D, et al. Total magnetic resonance imaging burden of small vessel disease in cerebral amyloid angiopathy an imaging-pathologic study of concept validation. *JAMA Neurol.* 2016;73(8):994–1001.
113. Fotiadis P, van Rooden S, van der Grond J, Schultz A, Martinez-Ramirez S, Auriel E, et al. Cortical atrophy in patients with cerebral amyloid angiopathy: A case-control study. *Lancet Neurol.* 2016;15(8):811–9.
114. Farid K, Charidimou A, Baron JC. Amyloid positron emission tomography in sporadic cerebral amyloid angiopathy: A systematic critical update. *Neuroimage Clin.* 2017;15:247–63.
115. Chang Y, Liu J, Wang L, Li X, Wang Z, Lin M, et al. Diagnostic Utility of Integrated¹¹C-Pittsburgh Compound B Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance for Cerebral Amyloid Angiopathy: A Pilot Study. *Front Aging Neurosci.* 2021;13.
116. Gurol ME, Becker JA, Fotiadis P, Riley G, Schwab K, Johnson KA, et al. Florbetapir-PET to diagnose cerebral amyloid angiopathy A prospective study. *American Academy of Neurology.* 2016;19:2043–9.
117. Greenberg SM, Grabowski T, Gurol ME, Skehan ME, Nandigam RNK, Becker JA, et al. Detection of isolated cerebrovascular β -amyloid with Pittsburgh compound B. *Ann Neurol.* 2008 Nov;64(5):587–91.
118. Ly J v, Donnan GA, Villemagne VL, Zavala JA, Ma H, O'keefe G, et al. C-PIB binding is increased in patients with cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *Neurology.* 2010;6:487–93.
119. Planton M, Saint-Aubert L, Raposo N, Payoux P, Salabert AS, Albucher JF, et al. Florbetapir Regional Distribution in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease: A PET Study. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2020;73(4):1607–14.
120. McCarter SJ, Lesnick TG, Lowe V, Mielke MM, Constantopoulos E, Rabinstein AA, et al. Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Its Association With Amyloid- β PET Signal. *Neurology.* 2021 Nov 2;97(18):e1799–808.

121. Han BH, Zhou ML, Vellimana AK, Milner E, Kim DH, Greenberg JK, et al. Resorufin analogs preferentially bind cerebrovascular amyloid: Potential use as imaging ligands for cerebral amyloid angiopathy. *Mol Neurodegener.* 2011;6(1):86.
122. Abrahamson EE, Stehouwer JS, Vazquez AL, Huang GF, Mason NS, Lopresti BJ, et al. Development of a PET radioligand selective for cerebral amyloid angiopathy. *Nucl Med Biol.* 2021 Jan 1;92:85–96.
123. Banerjee G, Ambler G, Keshavan A, Paterson RW, Foiani MS, Toombs J, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2020;74(4):1189–201.
124. Renard D, Castelnovo G, Wacogne A, le Floch A, Thouvenot E, Mas J, et al. Interest of CSF biomarker analysis in possible cerebral amyloid angiopathy cases defined by the modified Boston criteria. *J Neurol.* 2012;259(11):2429–33.
125. van Etten ES, Verbeek MM, van der Grond J, Zielman R, van Rooden S, van Zwet EW, et al. β -Amyloid in CSF: Biomarker for preclinical cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* 2017;88(2):169–76.
126. Verbeek MM, Kremer BPH, Rikkert MO, van Domburg PHMF, Skehan ME, Greenberg SM. Cerebrospinal fluid amyloid beta(40) is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 2009;66(2):245–9.
127. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2016 Jun 1;15(7):673–84.
128. Charidimou A, Friedrich JO, Greenberg SM, Viswanathan A. Core cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology.* 2018 Feb 27;90(9):e754–62.
129. Kuiperij HB, Hondius DC, Kersten I, Versleijen AAM, Rozemuller AJM, Greenberg SM, et al. Apolipoprotein D: a potential biomarker for cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020;46:431–40.
130. Vervuurt M, Zhu X, Schrader J, de Kort AM, Marques TM, Kersten I, et al. Elevated expression of urokinase plasminogen activator in rodent models and patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022 Aug 1;48(5).
131. Marazuela P, Solé M, Bonaterra-Pastra A, Pizarro J, Camacho J, Martínez-Sáez E, et al. MFG-E8 (LACTADHERIN): a novel marker associated with cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):154.
132. de Kort AM, Kuiperij HB, Kersten I, Versleijen AAM, Schreuder FHBM, van Nostrand WE, et al. Normal cerebrospinal fluid concentrations of PDGFR β in patients with cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* 2022 Oct 1;18(10):1788–96.

133. Banerjee G, Forsgard N, Ambler G, Keshavan A, Paterson RW, Foiani MS, et al. Cerebrospinal fluid metallomics in cerebral amyloid angiopathy: an exploratory analysis. *J Neurol*. 2022 Mar 1;269(3):1470–5.
134. Greenberg SM, Cho HS, O'Donnell HC, Rosand J, Segal AZ, Younkin LH, et al. Plasma β -amyloid peptide, transforming growth factor- β 1, and risk for cerebral amyloid angiopathy. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;903:144–9.
135. Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Penalba A, Rodriguez-Luna D, Molina CA, Rovira A, et al. Plasma β -amyloid levels in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Neurodegener Dis*. 2012 Apr;10(1–4):320–3.
136. Kim HJ, Park D, Yun G, Kim H, Kim HG, Lee KM, et al. Screening for cerebral amyloid angiopathy based on serological biomarkers analysis using a dielectrophoretic force-driven biosensor platform. *Lab Chip*. 2021 Dec 7;21(23):4557–65.
137. van Nostrand WE, Melchor JP, Romanov G, Zeigler K, Davis J. Pathogenic effects of cerebral amyloid angiopathy mutations in the amyloid β -protein precursor. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;977:258–65.
138. Wattendorff AR, Frangione B, Luyendijk W, Bots GTAM. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis, Dutch type (HCHWA-D): Clinicopathological studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;58(6):699–705.
139. Maat-Schieman M, Roos R, van Duinen S. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Neuropathology*. 2005 Dec;25(4):288–97.
140. Bugiani O, Giaccone G, Rossi G, Mangieri M, Capobianco R, Morbin M, et al. Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis Associated With the E693K Mutation of APP. *Arch Neurol*. 2010;67(8).
141. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condrón MM, Axelman K, Forsell C, et al. The “Arctic” APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001;4(9):887–93.
142. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Hup W van, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1992;1.
143. Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JPG, William Rebeck G, Greenberg SM. Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2001;49(6):697–705.
144. Nochlin D, Bird TD, Nemens EJ, Ball MJ, Sumi SM. Amyloid angiopathy in a Volga German family with Alzheimer’s disease and a presenilin-2 mutation (N141I). *Ann Neurol*. 1998 Jan;43(1):131–5.
145. Dermaut B, Kumar-Singh S, Jonghe C de, Cruts M, Löfgren A, Lübke U, et al. Cerebral amyloid angiopathy is a pathogenic lesion in Alzheimer’s disease due to a novel presenilin 1 mutation. Oxford University Press. 2001;124:2383–92.

146. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Ratio (Oxf)*. 2010;36(3):490–9.
147. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, Kokoris GJ, Takis C, Kanter DS, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 1996;27(8):1333–7.
148. Biffi A, Anderson CD, Desikan RS, Sabuncu M, Cortellini L, Schmansky N, et al. Genetic Variation and Neuroimaging Measures in Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 2010;67(6):677–85.
149. Inoue Y, Ando Y, Misumi Y, Ueda M. Current management and therapeutic strategies for cerebral amyloid angiopathy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8).
150. Greenberg SM, Vonsattel JPG, Segal AZ, Chiu RI, Clatworthy AE, Liao A, et al. Association of apolipoprotein E and ϵ 2 vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 1998;50(4):638–43.
151. Camacho J, Moliné T, Bonaterra-Pastra A, Cajal SRY, Martínez-Sáez E, Hernández-Guillamon M. Brain ApoA-I, ApoJ and ApoE immunodetection in cerebral amyloid angiopathy. *Front Neurol*. 2019;10:187.
152. Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Shoamanesh A, Oliveira-Filho J, Frosch M, Vashkevich A, et al. Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: Evidence for different disease phenotypes. *Neurology*. 2015 Mar 3;84(12):1206.
153. Biffi A, Shulman JM, Jagiella JM, Cortellini L, Ayres AM, Schwab K, et al. Genetic variation at CR1 increases risk of cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2012;78(5):334–41.
154. Domingues-Montanari S, Hernandez-Guillamon M, Fernandez-Cadenas I, Mendioroz M, Boada M, Munuera J, et al. ACE variants and risk of intracerebral hemorrhage recurrence in amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging*. 2011;32(3):551.e13-551.e22.
155. Mäkelä M, Kaivola K, Valori M, Paetau A, Polvikoski T, Singleton AB, et al. Alzheimer risk loci and associated neuropathology in a population-based study (Vantaa 85+). *Neurol Genet*. 2018;4(1).
156. Montañola A, de Retana SF, López-Rueda A, Merino-Zamorano C, Penalba A, Fernández-Álvarez P, et al. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med*. 2016;18(1):99–108.
157. Head E, Phelan MJ, Doran E, Kim RC, Poon WW, Schmitt FA, et al. Cerebrovascular pathology in Down syndrome and Alzheimer disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2017 Dec 1;5(1):93.

158. Buss L, Fisher E, Hardy J, Nizetic D, Groet J, Pulford L, et al. Intracerebral haemorrhage in Down syndrome: Protected or predisposed? *F1000Res*. 2016;5.
159. Alzheimer's Disease International. *World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*. 2019;
160. Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2021 Jul 1;8(3):313–21.
161. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 231–55.
162. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011 Mar;7(3):137–52.
163. Laws KR, Irvine K, Gale TM. Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry*. 2016;6(1):54.
164. Perveen A, Nephew B, Liu Y. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;
165. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. Vol. 179, *Cell*. Cell Press; 2019. p. 312–39.
166. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4).
167. Eratne D, Loi SM, Farrand S, Kelso W, Velakoulis D, Looi JCL. Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australasian Psychiatry*. 2018 Aug 1;26(4):347–57.
168. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol*. 2017 Aug 2;15(6).
169. Carmona-Iragui M, Videla L, Lleó A, Fortea J. Down syndrome, Alzheimer disease, and cerebral amyloid angiopathy: The complex triangle of brain amyloidosis. *Dev Neurobiol*. 2019 Jul 1;79(7):716–37.
170. Arriagada P v, Growdon JH, Tessa Hedley-Whyte ; E, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992;42:631–9.
171. Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Shiung MM, Weigand SD, Knopman DS, et al. β -amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol*. 2008 Feb;63(2):204–12.
172. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive

- Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(5):362–81.
173. Gallardo G, Holtzman DM. Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1184:187–203.
174. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* . 1997;56(4):321–39.
175. Thal DR, Capetillo-Zarate E, Tredici K del, Braak H. The Development of Amyloid β Protein Deposits in the Aged Brain. *Sci Aging Knowledge Environ* . 2006;6.
176. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. 2002;
177. Vinters H v. Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015;10(1):291–319.
178. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, Deteresa R, Hill R, et al. Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse h s s Is the Major Correlate of Cognitive Impairment. *Ann Neurol*. 1991;
179. Calderon-Garcidueñas AL, Duyckaerts C. Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*. 2018;145:325–37.
180. Tan C chen, Yu J tai, Tan M shan, Jiang T, Zhu X chen, Tan L. Neurobiology of Aging Autophagy in aging and neurodegenerative diseases : implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol Aging*. 2014;35(5):941–57.
181. Beharry C, Cohen LS, Di J, Ibrahim K, Briffa-mirabella S, Alonso AC. Tau-induced neurodegeneration : mechanisms and targets. 2014;30(2):346–58.
182. Kovacs GG. Invited review : Neuropathology of tauopathies : principles and practice. 2015;3–23.
183. Braak H, Braak E. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*. 1995;16(3):271–8.
184. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2011;7(3):263–9.
185. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2012 Jan;8(1):1–13.
186. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*. 2019 Mar 1;103(2):263–93.

187. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006 Oct;112(4):389–404.
188. Mirra S, Heyman A, McKeel D, Sumi S, Crain B, Brownlee L, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part 11. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* . 1991;41(4):479–86.
189. Se Thoe E, Fauzi A, Tang YQ, Chamyuang S, Chia AYY. A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2021 Jul 1;276.
190. Coric V, van Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW, et al. Safety and tolerability of the γ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2012 Nov;69(11):1430–40.
191. Scheltens P, de Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Ch  telat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2021;397:1577–90.
192. Zampar S, Wirths O. Immunotherapy Targeting Amyloid- β Peptides in Alzheimer's. *Alzheimer's Disease: Drug Discovery.* 2020 Dec 18;23–49.
193. Bittar A, Bhatt N, Kaye R. Advances and considerations in AD tau-targeted immunotherapy. *Neurobiol Dis.* 2020 Feb 1;134.
194. Marron EM, Viejo-Sobera R, Quintana M, Redolar-Ripoll D, Rodríguez D, Garolera M. Transcranial magnetic stimulation intervention in Alzheimer's disease: A research proposal for a randomized controlled trial NCT03121066 NCT. *BMC Res Notes.* 2018 Sep 5;11(1).
195. Mullard A. FDA approval for Biogen's aducanumab sparks Alzheimer disease firestorm. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(7):596.
196. Dhadda S, Kanekiyo M, Li D, Swanson CJ, Irizarry M, Berry S, et al. Consistency of efficacy results across various clinical measures and statistical methods in the lecanemab phase 2 trial of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2022 Dec 1;14(1):182.
197. Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016 Aug 31;537(7618):50–6.
198. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2022 Nov 29;
199. Sperling RA, Jack CR, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's and Dementia.* 2011 Jul;7(4):367–85.

200. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2014 Jan 23;370(4):322–33.
201. di Francesco JC, Longoni M, Piazza F. Anti-A β autoantibodies in amyloid related imaging abnormalities (ARIA): Candidate biomarker for immunotherapy in Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front Neurol*. 2015;6(SEP).
202. Minoshima S, Mosci K, Cross D, Thientunyakit T. Brain [F-18]FDG PET for Clinical Dementia Workup: Differential Diagnosis of Alzheimer's Disease and Other Types of Dementing Disorders. *Semin Nucl Med*. 2021 May 1;51(3):230–40.
203. Arbizu J, Festari C, Altomare D, Walker Z, Bouwman F, Rivolta J, et al. Clinical utility of FDG-PET for the clinical diagnosis in MCI. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018 Jul 1;45(9):1497–508.
204. Levin F, Ferreira D, Lange C, Dyrba M, Westman E, Buchert R, et al. Data-driven FDG-PET subtypes of Alzheimer's disease-related neurodegeneration. *Alzheimers Res Ther*. 2021 Dec 1;13(1).
205. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2018 Apr 1;14(4):535–62.
206. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1).
207. Jie CVML, Treyer V, Schibli R, Mu L. TauvidTM: The first FDA-approved pet tracer for imaging tau pathology in Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*. 2021 Feb 1;14(2):1–12.
208. Groot C, Villeneuve S, Smith R, Hansson O, Ossenkoppele R. Tau PET Imaging in Neurodegenerative Disorders. *J Nucl Med*. 2022 Jun 1;63:20S-26S.
209. Mattsson N, Lönneborg A, Boccardi M, Blennow K, Hansson O. Clinical validity of cerebrospinal fluid A β 42, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging*. 2017 Apr 1;52:196–213.
210. Mahaman YAR, Embaye KS, Huang F, Li L, Zhu F, Wang JZ, et al. Biomarkers used in Alzheimer's disease diagnosis, treatment, and prevention. *Ageing Res Rev*. 2022 Feb 1;74.
211. Hu X, Yang Y, Gong D. A meta-analysis of cerebrospinal fluid visinin-like protein-1 in Alzheimer's disease patients relative to healthy controls and mild cognitive impairment patients. *Neurosciences*. 2017;22(2):94–101.

212. Brinkmalm A, Brinkmalm G, Honer WG, Frölich L, Hausner L, Minthon L, et al. SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2014;9:53.
213. Davidsson P, Blennow K, Davidsson SP, Blennow K. Dementia Neurochemical Dissection of Synaptic Pathology in Alzheimer's Disease. *International Psychogeriatric Association*. 1998;10(1).
214. Öhrfelt A, Brinkmalm A, Dumurgier J, Brinkmalm G, Hansson O, Zetterberg H, et al. The pre-synaptic vesicle protein synaptotagmin is a novel biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2016 Oct 3;8(1):1–10.
215. Sandelius Å, Portelius E, Källén Å, Zetterberg H, Rot U, Olsson B, et al. Elevated CSF GAP-43 is Alzheimer's disease specific and associated with tau and amyloid pathology. *Alzheimer's and Dementia*. 2019 Jan 1;15(1):55–64.
216. Mohaupt P, Pons ML, Vialaret J, Delaby C, Hirtz C, Lehmann S. β -Synuclein as a candidate blood biomarker for synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2022 Dec 1;14(1).
217. Kester MI, Teunissen CE, Crimmins DL, Herries EM, Ladenson JKH, Scheltens P, et al. Neurogranin as a cerebrospinal fluid biomarker for synaptic loss in symptomatic Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2015 Nov 1;72(11):1275–80.
218. Schindler SE, Bollinger JG, Ovod V, Mawuenyega KG, Li Y, Gordon BA, et al. High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology*. 2019 Oct 22;93(17):E1647–59.
219. Brand AL, Lawler PE, Bollinger JG, Li Y, Schindler SE, Li M, et al. The performance of plasma amyloid beta measurements in identifying amyloid plaques in Alzheimer's disease: a literature review. *Alzheimers Res Ther*. 2022 Dec 27;14(1):195.
220. Mankhong S, Kim S, Lee S, Kwak HB, Park DH, Joa KL, et al. Development of Alzheimer's Disease Biomarkers: From CSF-to Blood-Based Biomarkers. *Biomedicines*. 2022 Apr 1;10(4).
221. Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT, Zetterberg H, Lopera F, Stomrud E, et al. Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2020 Aug 25;324(8):772–81.
222. Tatebe H, Kasai T, Ohmichi T, Kishi Y, Kakeya T, Waragai M, et al. Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: Pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Mol Neurodegener*. 2017 Sep 4;12(1).
223. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, et al. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018 Feb 8;554(7691):249–54.

224. Lewczuk P, Ermann N, Andreasson U, Schultheis C, Podhorna J, Spitzer P, et al. Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2018 Jul 28;10(1).
225. Chatterjee P, Pedrini S, Stoops E, Goozee K, Villemagne VL, Asih PR, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein is elevated in cognitively normal older adults at risk of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2021 Jun 1;11(1).
226. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, et al. Cerebrospinal Fluid-Amyloid 42 and Tau Proteins as Biomarkers of Alzheimer-Type Pathologic Changes in the Brain. *Arch Neurol.* 2009;66(3):382–9.
227. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* 2011;7(3):280–92.
228. Uddin MdS, Hasana S, Hossain MdF, Islam MdS, Behl T, Perveen A, et al. Molecular Genetics of Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease. *Curr Gene Ther.* 2020 Nov 24;21(1):43–52.
229. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry.* 2015;77(1):43–51.
230. Motte J, Williams RS. Age-related changes in the density and morphology of plaques and neurofibrillary tangles in Down syndrome brain*. *Acta Neuropathol.* 1989;77:535–46.
231. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;122:1131–5.
232. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(20):9649–53.
233. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994;7(2):180–4.
234. Reiman EM, Arboleda-Velasquez JF, Quiroz YT, Huentelman MJ, Beach TG, Caselli RJ, et al. Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
235. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2013;45(12):1452–8.

236. Replogle J, Chan G, White C, Raj T, Winn P, Evans D, et al. A TREM1 variant alters the accumulation of Alzheimer-related amyloid pathology. *Ann Neurol*. 2015;73(3):469–77.
237. Giri M, Zhang M, Lü Y. Genes associated with Alzheimer's disease: An overview and current status. *Clin Interv Aging*. 2016;11:665–81.
238. Marioni RE, Harris SE, Zhang Q, McRae AF, Hagenaars SP, Hill WD, et al. GWAS on family history of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2018 Dec 1;8(1).
239. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet*. 2019 Mar 1;51(3):414–30.
240. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet*. 2019 Mar 1;51(3):404–13.
241. Andrews SJ, Fulton-Howard B, Goate A. Interpretation of risk loci from genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2020 Apr 1;19(4):326–35.
242. Myers A, McGonigle P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Neurosci*. 2019 Sep 1;89(1).
243. Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, de Strooper B, et al. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J*. 2017 Sep;36(17):2473–87.
244. Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, et al. A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci*. 2004;7(9):954–60.
245. Davis J, Xu F, Deane R, Romanov G, Previti M, Zeigler K, et al. Early-onset and Robust Cerebral Microvascular Accumulation of Amyloid β -Protein in Transgenic Mice Expressing Low Levels of a Vasculotropic Dutch/Iowa Mutant Form of Amyloid β -Protein Precursor. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 May 7;279(19):20296–306.
246. Jäkel L, van Nostrand WE, Nicoll JAR, Werring DJ, Verbeek MM. Animal models of cerebral amyloid angiopathy. *Clin Sci*. 2017 Oct 1;131(19):2469–88.
247. Shih AY, Hyacinth I, Hartmann DA, van Veluw SJ. Rodent models of cerebral microinfarct and microhemorrhage. *Stroke*. 2018;49(3):803–10.
248. Reuter B, Venus A, Heiler P, Schad L, Ebert A, Hennerici MG, et al. Development of cerebral microbleeds in the APP23-transgenic mouse model of cerebral amyloid angiopathy—a 9.4 tesla MRI study. *Front Aging Neurosci*. 2016;8(JUN):1–9.

249. Beckmann N, Doelemeyer A, Zurbruegg S, Bigot K, Theil D, Frieauff W, et al. Longitudinal noninvasive magnetic resonance imaging of brain microhemorrhages in BACE inhibitor-treated APP transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2016;45:50–60.
250. Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney a L, Stalder M, Tolnay M, Wiederhold KH, et al. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):14088–93.
251. Kokjohn TA, Roher AE. Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: Understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimer's and Dementia*. 2009 Jul;5(4):340–7.
252. Marazuela P, Paez-montserrat B, Bonaterra-pastra A, Solé M, Hernández-guillamon M. Impact of Cerebral Amyloid Angiopathy in Two Transgenic Mouse Models of Cerebral β -Amyloidosis: A Neuropathological Study. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4972):1–16.
253. Eede P, Obst J, Benke E, Yvon-Durocher G, Richard BC, Gimber N, et al. Interleukin-12/23 deficiency differentially affects pathology in male and female Alzheimer's disease-like mice. *EMBO Rep*. 2020;21(3):1–18.
254. López-Picón FR, Snellman A, Eskola O, Helin S, Solin O, Haaparanta-Solin M, et al. Neuroinflammation appears early on PET imaging and then plateaus in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018 Mar 1;59(3):509–15.
255. Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, C Sturchler-Pierrat, et al. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature*. 1998;39(6704):755–6.
256. Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, Schlecht HP, Carver K, Maguire E, et al. Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2003;24:365–78.
257. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*. 2014;5(APR).
258. Giménez-Llort L, Marin-Pardo D, Marazuela P, del Hernández-Guillamón MM. Survival bias and crosstalk between chronological and behavioral age: Age- and genotype-sensitivity tests define behavioral signatures in middle-aged, old, and long-lived mice with normal and ad-associated aging. *Biomedicines*. 2021 Jun 1;9(6).
259. Snellman A, López-Picón FR, Rokka J, Salmona M, Forloni G, Scheinin M, et al. Longitudinal amyloid imaging in mouse brain with ^{11}C -PIB: Comparison of APP23, Tg2576, and APPswe-PS1dE9 mouse models of Alzheimer disease. *Journal of Nuclear Medicine*. 2013 Aug 1;54(8):1434–41.

260. Maia LF, Kaeser SA, Reichwald J, Hruscha M, Martus P, Staufenbiel M, et al. Changes in amyloid- β and tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Sci Transl Med*. 2013 Jul 10;5(194).
261. Björkhem I, Meaney S, Fogelman AM. Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 May;24(5):806–15.
262. Saher G, Stumpf SK. Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2015 Aug 1;1851(8):1083–94.
263. Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*. 2015 Apr 1;6(4):254–64.
264. Braun V, Hantke K. Lipoproteins: Structure, Function, Biosynthesis. *Subcell Biochem*. 2019;92:39–77.
265. Feingold KR. Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2022 Sep 1;51(3):437–58.
266. Bricarello DA, Smilowitz JT, Zivkovic AM, German JB, Parikh AN. Reconstituted lipoprotein: A versatile class of biologically-inspired nanostructures. *ACS Nano*. 2011 Jan 25;5(1):42–57.
267. Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med*. 2016;94(7):739–46.
268. Freeman MW, Walford GA. Lipoprotein Metabolism and the Treatment of Lipid Disorders. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Seventh Ed. 2015;1–2:715-736.e7.
269. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: Focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(4):312–8.
270. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005 Jun 24;96(12):1221–32.
271. Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol*. 2015;6(OCT):222.
272. Silva IT, Mello APQ, Damasceno NRT. Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A2(Lp-PLA2): A review. *Lipids Health Dis*. 2011;10.
273. Ladu MJ, Reardon C, van Eldik L, Fagan AM, Bu G, Holtzman D, et al. Lipoproteins in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;903(847):167–75.
274. Wang H, Eckel RH. What are lipoproteins doing in the brain? *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2014;25(1):8–14.

275. Hoofnagle AN, Heinecke JW. Lipoproteomics: Using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res.* 2009;50(10):1967–75.
276. Woudberg NJ, Pedretti S, Lecour S, Schulz R, Vuilleumier N, James RW, et al. Pharmacological intervention to modulate HDL: What do we target? *Front Pharmacol.* 2018 Jan 22;8(JAN).
277. Moriyama K, Takahashi E. HDL2/HDL3 Ratio Changes, Metabolic Syndrome Markers, and Other Factors in a Japanese Population. *J Atheroscler Thromb.* 2016;23:704–12.
278. Nikeghbalian S, Rahimi R, Nikoupour H, Soleimani N, Vakili S, Zal F, et al. Correlation between HDL2, HDL3 and serum ferritin levels with fatty liver and NAFLD activity score (NAS) in liver histology of organ donors. *BMC Gastroenterol.* 2021 Dec 1;21(1).
279. Reed B, Ph D, Villeneuve S, Ph D, Mack W, Ph D, et al. Low HDL and High LDL Serum Cholesterol are Associated with cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol.* 2014;71(2):195–200.
280. Gardener H, Caunca MR, Dong C, Cheung YK, Elkind MSV, Sacco RL, et al. Ultrasound Markers of Carotid Atherosclerosis and Cognition. *Stroke.* 2017 Jul 1;48(7):1855–61.
281. Burillo J, Marqués P, Jiménez B, González-Blanco C, Benito M, Guillén C. Insulin resistance and diabetes mellitus in alzheimer's disease. *Cells.* 2021 May 1;10(5).
282. Zhu TB, Zhang Z, Luo P, Wang SS, Peng Y, Chu SF, et al. Lipid metabolism in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 2019 Jan 1;144:68–74.
283. Chu CS, Tseng PT, Stubbs B, Chen TY, Tang CH, Li DJ, et al. Use of statins and the risk of dementia and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.
284. Rasmussen KL, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. Plasma levels of apolipoprotein E and risk of dementia in the general population. *Ann Neurol.* 2015 Feb 1;77(2):301–11.
285. Reitz C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's Disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(3):1–14.
286. Zuliani G, Cavalieri M, Galvani M, Volpato S, Cherubini A, Bandinelli S, et al. Relationship between low levels of high-density lipoprotein cholesterol and dementia in the elderly. the inchianti study. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences.* 2010 May;65 A(5):559–64.
287. Button EB, Robert J, Caffrey TM, Fan J, Zhao W, Wellington CL. HDL from an Alzheimer's disease perspective. *Curr Opin Lipidol.* 2019;30(3):224–34.

288. Kim WS, He Y, Phan K, Ahmed RM, Rye KA, Piguet O, et al. Altered high density lipoprotein composition in behavioral variant frontotemporal dementia. *Front Neurosci.* 2018;12(NOV):1–10.
289. Pedrini S, Doecke JD, Hone E, Wang P, Thota R, Bush AI, et al. Plasma high-density lipoprotein cargo is altered in Alzheimer's disease and is associated with regional brain volume. *J Neurochem.* 2022;(July):1–15.
290. Wang X, Dong Y, Qi X, Huang C, Hou L. Cholesterol levels and risk of hemorrhagic stroke: A systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2013;44(7):1833–9.
291. Pezzini A, Grassi M, Iacoviello L, Zedde M, Marcheselli S, Silvestrelli G, et al. Serum cholesterol levels, HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of intracerebral haemorrhage. The Multicenter Study on Cerebral Haemorrhage in Italy (MUCH-Italy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016 Sep;87(9):924–9.
292. Gurevitz C, Auriel E, Elis A, Kornowski R. The Association between Low Levels of Low Density Lipoprotein Cholesterol and Intracerebral Hemorrhage: Cause for Concern? *J Clin Med.* 2022 Jan 21;11(3):536.
293. Rodriguez-Luna D, Rubiera M, Ribo M, Coscojuela P, Pagola J, Piñeiro S, et al. Serum low-density lipoprotein cholesterol level predicts hematoma growth and clinical outcome after acute intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2011;42(9):2447–52.
294. Romero JR, Preis SR, Beiser A, Decarli C, Viswanathan A, Martinez-Ramirez S, et al. Risk factors, stroke prevention treatments, and prevalence of cerebral microbleeds in the framingham heart study. *Stroke.* 2014;45(5):1492–4.
295. Ding J, Sigurdsson S, Garcia M, Phillips CL, Eirikdottir G, Gudnason V, et al. Risk Factors Associated With Incident Cerebral Microbleeds According to Location in Older People: The Age/ Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik Study. *JAMA Neurol.* 2015;72(6):682–8.
296. Naj AC, Schellenberg GD. Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: An overview. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics.* 2017 Jan 1;174(1):5–26.
297. Sun Y, Shi J, Zhang S, Tang M, Han H, Guo Y, et al. The APOC3 SstI polymorphism is weakly associated with sporadic Alzheimer's disease in a Chinese population. *Neurosci Lett.* 2005;380(3):219–22.
298. Vollbach H, Heun R, Morris CM, Edwardson JA, McKeith IG, Jessen F, et al. APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann Neurol.* 2005;58(3):436–41.
299. Nam KN, Mounier A, Wolfe CM, Fitz NF, Carter AY, Castranio EL, et al. Effect of high fat diet on phenotype, brain transcriptome and lipidome in Alzheimer's model mice. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).

300. Fitz NF, Cronican A, Pham T, Fogg A, Fauq AH, Chapman R, et al. Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *Journal of Neuroscience*. 2010 May 19;30(20):6862–72.
301. Koldamova R, Staufienbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Dec 30;280(52):43224–35.
302. Lefterov I, Fitz NF, Cronican AA, Fogg A, Lefterov P, Kodali R, et al. Apolipoprotein A-I deficiency increases cerebral amyloid angiopathy and cognitive deficits in APP/PS1ΔE9 mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Nov 19;285(47):36945–57.
303. Lewis TL, Cao D, Lu H, Mans RA, Su YR, Jungbauer L, et al. Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Nov 19;285(47):36958–68.
304. Chen Y, Strickland MR, Soranno A, Holtzman DM. Apolipoprotein E: Structural Insights and Links to Alzheimer Disease Pathogenesis. *Neuron*. 2021 Jan 20;109(2):205–21.
305. Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: Role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res*. 1990;31(8):1503–11.
306. Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol*. 2021 Jan 1;20(1):68–80.
307. Serrano-Pozo A, Qian J, Monsell SE, Betensky RA, Hyman BT. APOE ϵ 2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2015 Jun 1;77(6):917–29.
308. Li Z, Shue F, Zhao N, Shinohara M, Bu G. APOE2: protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2020 Dec 1;15(1).
309. Fernández-Calle R, Konings SC, Frontiñán-Rubio J, García-Revilla J, Camprubí-Ferrer L, Svensson M, et al. APOE in the bullseye of neurodegenerative diseases: impact of the APOE genotype in Alzheimer's disease pathology and brain diseases. *Mol Neurodegener*. 2022 Dec 1;17(1).
310. Rasmussen KL. Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype and risk of dementia and ischemic heart disease: A review. *Atherosclerosis*. 2016;255:145–55.
311. Rezeli M, Zetterberg H, Blennow K, Brinkmalm A, Laurell T, Hansson O, et al. Quantification of total apolipoprotein E and its specific isoforms in cerebrospinal

- fluid and blood in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *EuPA Open Proteom.* 2015 Sep 1;8:137–43.
312. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *National Institutes of Health.* 2000;
313. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *nat genet.* 1997;17(3):263–4.
314. Holtzman D, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, et al. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid- β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 1999;103(6).
315. Bell RD, Sagare A, Friedman AE, Bedi G, Holtzman DM, Deane R, et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid β -peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism.* 2007;27(5):909–18.
316. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. ApoE isoform – specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 2008;118(12):4002–13.
317. Liu CC, Hu J, Zhao N, Wang J, Wang N, Cirrito JR, et al. Astrocytic LRP1 mediates brain A β clearance and impacts amyloid deposition. *Journal of Neuroscience.* 2017 Apr 12;37(15):4023–31.
318. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, et al. ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 7;110(19).
319. Yin Y, Wang Z. ApoE and neurodegenerative diseases in aging. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1086:77–92.
320. Xiong M, Jiang H, Serrano JR, Gonzales ER, Wang C, Gratuze M, et al. APOE immunotherapy reduces cerebral amyloid angiopathy and amyloid plaques while improving cerebrovascular function. *Sci Transl Med.* 2021;13(581).
321. Hondius DC, Eigenhuis KN, Morrema THJ, van der Schors RC, van Nierop P, Bugiani M, et al. Proteomics analysis identifies new markers associated with capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):46.
322. Gupta VB, Laws SM, Villemagne VL, Ames D, Bush AI, Ellis KA, et al. Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk The AIBL study of aging. *Neurology* ®. 2011;76:1091–8.

323. Koch M, DeKosky ST, Fitzpatrick AL, Furtado JD, Lopez OL, Kuller LH, et al. Apolipoproteins and Alzheimer's pathophysiology. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*. 2018 Jan 1;10:545–53.
324. Morton AM, Furtado JD, Mendivil CO, Sacks FM. Dietary unsaturated fat increases HDL metabolic pathways involving apoE favorable to reverse cholesterol transport. *JCI Insight*. 2019;4(7):1–14.
325. Robert J, Button EB, Martin EM, McAlary L, Gidden Z, Gilmour M, et al. Cerebrovascular amyloid Angiopathy in bioengineered vessels is reduced by high-density lipoprotein particles enriched in Apolipoprotein e. *Mol Neurodegener*. 2020;15(1):1–21.
326. de Silva H v., Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, et al. A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(22):13240–7.
327. Foster EM, Dangla-Valls A, Lovestone S, Ribe EM, Buckley NJ. Clusterin in Alzheimer's disease: Mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. *Front Neurosci*. 2019;13(FEB):1–27.
328. Mcdonald JF, Nelsestuen GL. Potent Inhibition of Terminal Complement Assembly by Clusterin : Characterization of Its Impact on C9 Polymerization. 1997;5(6):7464–73.
329. Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Mar 12;274(11):6875–81.
330. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1094–9.
331. Yu JT, Tan L. The role of clusterin in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis, and therapy. Vol. 45, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc.; 2012. p. 314–26.
332. Tan L, Wang H fu, Tan M shan, Tan C chen, Zhu X chen, Miao D, et al. Effect of CLU genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging markers in healthy , mild cognitive impairment and Alzheimer ' s disease cohorts. *Nature Publishing Group*. 2016;(April):1–12.
333. Szymanski M, Wang R, Bassett SS, Avramopoulos D. Alzheimer's risk variants in the clusterin gene are associated with alternative splicing. *Transl Psychiatry*. 2011;1.
334. Xing YY, Yu JT, Cui WZ, Zhong XL, Wu ZC, Zhang Q, et al. Blood clusterin levels, rs9331888 polymorphism, and the risk of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;29(3):515–9.

335. Cai R, Han J, Sun J, Huang R, Tian S, Shen Y, et al. Plasma clusterin and the CLU gene rs11136000 variant are associated with mild cognitive impairment in type 2 diabetic patients. *Front Aging Neurosci.* 2016;8(JUN):179.
336. Zlokovic B v., Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, et al. Glycoprotein 330/megalin: Probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid β at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4229–34.
337. Howlett DR, Hortobágyi T, Francis PT. Clusterin associates specifically with A β 40 in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain Pathol.* 2013 Nov;23(6):623–32.
338. Manousopoulou A, Gatherer M, Smith C, Nicoll JAR, Woelk CH, Johnson M, et al. Systems proteomic analysis reveals that clusterin and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 increase in leptomenigeal arteries affected by cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017 Oct 1;43(6):492–504.
339. Miners JS, Clarke P, Love S. Clusterin levels are increased in Alzheimer's disease and influence the regional distribution of A β . *Brain Pathology.* 2017;27(3):305–13.
340. Schrijvers EMC, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 2011 Apr;305(13):1322–6.
341. Gupta VB, Doecke JD, Hone E, Pedrini S, Laws SM, Thambisetty M, et al. Plasma apolipoprotein J as a potential biomarker for Alzheimer's disease: Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle study of aging. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring.* 2016;3:18–26.
342. Koch M, Jensen MK. HDL-cholesterol and apolipoproteins in relation to dementia. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(1):76–87.
343. Delabar JM, Ortner M, Simon S, Wijkhuisen A, Feraudet-Tarisse C, Pegon J, et al. Altered age-linked regulation of plasma DYRK1A in elderly cognitive complainers (INSIGHT-preAD study) with high brain amyloid load. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions.* 2020;6(1):1–7.
344. Weinstein G, Beiser AS, Preis SR, Courchesne P, Chouraki V, Levy D, et al. Plasma clusterin levels and risk of dementia, Alzheimer's disease, and stroke. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring.* 2016;3:103–9.
345. Ko YA, Billheimer JT, Lyssenko NN, Kueider-Paisley A, Wolk DA, Arnold SE, et al. ApoJ/Clusterin concentrations are determinants of cerebrospinal fluid cholesterol efflux capacity and reduced levels are associated with Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2022 Dec 1;14(1):194.
346. Tang L, Wang ZB, Ma LZ, Cao XP, Tan L, Tan MS. Dynamic changes of CSF clusterin levels across the Alzheimer's disease continuum. *BMC Neurol.* 2022 Dec 1;22(1):508.

347. Wojtas AM, Sens JP, Kang SS, Baker KE, Berry TJ, Kurti A, et al. Astrocyte-derived clusterin suppresses amyloid formation in vivo. *Mol Neurodegener.* 2020 Dec 1;15(1).
348. Calero M, Tokuda T, Rostagno A, Kumar A, Zlokovic B, Frangione B, et al. Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin). *Biochemical Journal.* 1999;344(2):375–83.
349. Beeg M, Stravalaci M, Romeo M, Carrá AD, Cagnotto A, Rossi A, et al. Clusterin binds to A β 1-42 Oligomers with high affinity and interferes with peptide aggregation by inhibiting primary and secondary nucleation. *Journal of Biological Chemistry.* 2016;291(13):6958–66.
350. Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, et al. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *The FASEB Journal.* 2007 Aug;21(10):2312–22.
351. Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic B v. Role of clusterin in the brain vascular clearance of amyloid- β . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Aug;114(33):8681–2.
352. Yeh FL, Hansen D v, Sheng M. Focus Issue : Feature Review Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med.* 2017;23(6):512–33.
353. DeMattos RB, O'dell MA, Parsadanian M, Taylor JW, Harmony JAK, Bales KR, et al. Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10843–8.
354. Wojtas AM, Kang SS, Olley BM, Gatherer M, Shinohara M, Lozano PA, et al. Loss of clusterin shifts amyloid deposition to the cerebrovasculature via disruption of perivascular drainage pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Aug;114(33):E6962–71.
355. Oh SB, Kim MS, Park SJ, Son HJ, Kim SY, Kim MS, et al. Clusterin contributes to early stage of Alzheimer's disease pathogenesis. *Brain Pathology.* 2019 Mar 1;29(2):217–31.
356. Qi XM, Wang C, Chu XK, Li G, Ma JF. Intraventricular infusion of clusterin ameliorated cognition and pathology in Tg6799 model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 2018 Jan 25;19(2):1–9.
357. Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Esquerda-Canals G, Roda AR, Serra-Mir G, Lope-Piedrafita S, et al. Differential effects of apoE and apoJ mimetic peptides on the action of an anti-A β scFv in 3xTg-AD mice. *Biochem Pharmacol.* 2018 Sep 1;155:380–92.
358. Chen F, Swartzlander DB, Ghosh A, Fryer JD, Wang B, Zheng H. Clusterin secreted from astrocyte promotes excitatory synaptic transmission and ameliorates Alzheimer's disease neuropathology. *Mol Neurodegener.* 2021 Dec 1;16(1):1–16.

359. Fernández de Retana S, Marazuela P, Solé M, Colell G, Bonaterra A, Sánchez-Quesada JL, et al. Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin modulates brain beta-amyloid levels in APP23 mice. *Alzheimers Res Ther.* 2019;11(1):1–17.
360. McKhann G, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack Jr. CR, Kawas CH, et al. the diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):263–9.
361. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975 Nov;12(3):189–98.
362. Macellari F, Paciaroni M, Agnelli G, Caso V. Neuroimaging in intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2014;45(3):903–8.
363. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2013;12(8):822–38.
364. Cordonnier C, Potter GM, Jackson CA, Doubal F, Keir S, Sudlow CLM, et al. Improving interrater agreement about brain microbleeds: Development of the Brain Observer MicroBleed Scale (BOMBS). *Stroke.* 2009;40(1):94–9.
365. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR Signal Abnormalities At 1.5-T in Alzheimer Dementia and Normal Aging. *American Journal of Roentgenology.* 1987;149(2):351–6.
366. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002 Dec;106(25):3143–421.
367. Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Otal C, Franco M, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res.* 2002;43(5):699–705.
368. Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, González-Sastre F, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation.* 2003;108(1):92–6.
369. Sánchez-Quesada JL, Vinagre I, de Juan-Franco E, Sánchez-Hernández J, Bonet-Marques R, Blanco-Vaca F, et al. Impact of the LDL subfraction phenotype on Lp-PLA2 distribution, LDL modification and HDL composition in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12(1):1–8.

370. Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, et al. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis*. 2002 Jan;160(1):223–32.
371. de Juan-Franco E, Pérez A, Ribas V, Sánchez-Hernández JA, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J, et al. Standardization of a method to evaluate the antioxidant capacity of high-density lipoproteins. *International Journal of Biomedical Science*. 2009;5(4):402–10.
372. Merino-Zamorano C, Retana SF de, Montañola A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, et al. Modulation of Amyloid- β 1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;53(2):677–91.
373. Fernández-De-Retana S, Cano-Sarabia M, Marazuela P, Sánchez-Quesada JL, García-Leon A, Montañola A, et al. Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
374. Jang H, Chun MY, Kim HJ, Na DL, Seo SW. The effects of imaging markers on clinical trajectory in cerebral amyloid angiopathy: a longitudinal study in a memory clinic. *Alzheimers Res Ther*. 2023 Jan 12;15(1):14.
375. Beecham GW, Hamilton K, Naj AC, Martin ER, Huentelman M, Myers AJ, et al. Genome-Wide Association Meta-analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias. *PLoS Genet*. 2014;10(9).
376. Blumenau S, Foddiss M, Müller S, Holtgrewe M, Bentele K, Berchtold D, et al. Investigating APOE, APP-A β metabolism genes and Alzheimer's disease GWAS hits in brain small vessel ischemic disease. *Sci Rep*. 2020;10(1).
377. Benitez BA, Jin SC, Guerreiro R, Graham R, Lord J, Harold D, et al. Missense variant in TREML2 protects against Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35(6).
378. Wei CJ, Cui P, Li H, Lang WJ, Liu GY, Ma XF. Shared genes between Alzheimer's disease and ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(8):855–64.
379. Shulman JM, Chen K, Keenan BT, Chibnik LB, Fleisher A, Thiyyagura P, et al. Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. *JAMA Neurol*. 2013;70(9):1150–7.
380. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain-barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584–96.
381. Yu JT, Tan L. The role of clusterin in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis, and therapy. *Mol Neurobiol*. 2012;45(2):314–26.

382. Sawyer RP, Demel SL, Comeau ME, Marion M, Rosand J, Langefeld CD, et al. Alzheimer's disease related single nucleotide polymorphisms and correlation with intracerebral hemorrhage incidence. *Medicine*. 2022;101(39):e30782.
383. Allen M, Zou F, Chai HS, Younkin CS, Crook J, Shane Pankratz V, et al. Novel late-onset Alzheimer disease loci variants associate with brain gene expression. *Neurology*. 2012;79(3):221–8.
384. Ling IF, Bhongsatiern J, Simpson JF, Fardo DW, Estus S. Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS One*. 2012;7(4).
385. Schürmann B, Wiese B, Bickel H, Weyerer S, Riedel-Heller SG, Pentzek M, et al. Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011;25(3):421–4.
386. Mullan GM, McEneny J, Fuchs M, McMaster C, Todd S, McGuinness B, et al. Plasma clusterin levels and the rs11136000 genotype in individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013 Nov;10(9):973–8.
387. Shams M, Shams S, Martola J, Cavallin L, Granberg T, Kaijser M, et al. MRI Markers of Small Vessel Disease and the APOE Allele in Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:897674.
388. Martínez-Lizana E, Carmona-Iragui M, Alcolea D, Gómez-Choco M, Vilaplana E, Sánchez-Saudinós MB, et al. Cerebral amyloid angiopathy-related atraumatic convexal subarachnoid hemorrhage: An ARIA before the tsunami. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2015 May 5;35(5):710–7.
389. Shoamanesh A, Preis SR, Beiser AS, Vasani RS, Benjamin EJ, Carlos S, et al. Inflammatory biomarkers, cerebral microbleeds, and small vessel disease Framingham Heart Study. 2015;
390. Rasmussen KL. Plasma levels of apolipoprotein E, APOE genotype and risk of dementia and ischemic heart disease: A review. *Atherosclerosis*. 2016 Dec 1;255:145–55.
391. Rivas-Urbina A, Rull A, Aldana-Ramos J, Santos D, Puig N, Farre-Cabrero N, et al. Subcutaneous administration of apolipoprotein j-derived mimetic peptide d-[113–122]apoJ improves LDL and HDL function and prevents atherosclerosis in LDLR-KO mice. *Biomolecules*. 2020 Jun 1;10(6).
392. Robert J, Button EB, Martin EM, McAlary L, Gidden Z, Gilmour M, et al. Cerebrovascular amyloid Angiopathy in bioengineered vessels is reduced by high-density lipoprotein particles enriched in Apolipoprotein e. *Mol Neurodegener*. 2020 Mar 25;15(1).
393. Iturria-Medina Y, Sotero RC, Toussaint PJ, Mateos-Pérez JM, Evans AC, Weiner MW, et al. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun*. 2016 Jun 21;7.

394. Cordonnier C, van der Flier WM. Brain microbleeds and Alzheimer's disease: Innocent observation or key player? *Brain*. 2011;134(2):335–44.
395. Kim HW, Hong J, Jeon JC. Cerebral Small Vessel Disease and Alzheimer's Disease: A Review. *Front Neurol*. 2020 Aug 25;11.
396. Bonaterra-Pastra A, Fernández-De-retana S, Rivas-Urbina A, Puig N, Benítez S, Pancorbo O, et al. Comparison of plasma lipoprotein composition and function in cerebral amyloid angiopathy and alzheimer's disease. *Biomedicines*. 2021;9(1):1–14.
397. Wang X, Dons Y, Xiangquian Q, Chengguang H, Lijun H. Cholesterol Levels and Risk of Hemorrhagic Stroke A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2013;44(SUPPL. 1).
398. Pezzini A, Grassi M, Iacoviello L, Zedde M, Marcheselli S, Silvestrelli G, et al. Serum cholesterol levels, HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of intracerebral haemorrhage. the Multicenter Study on Cerebral Haemorrhage in Italy (MUCH-Italy). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Sep 1;87(9):924–9.
399. Appleton JP, Scutt P, Sprigg N, Bath PM. Hypercholesterolaemia and vascular dementia. *Clin Sci*. 2017;131(14):1561–78.
400. Romero JR, Demissie S, Beiser A, Himali JJ, DeCarli C, Levy D, et al. Relation of plasma β -amyloid, clusterin, and tau with cerebral microbleeds: Framingham Heart Study. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Jul 1;7(7):1083–91.
401. Phuah CL, Raffeld MR, Ayres AM, Viswanathan A, Greenberg SM, Biffi A, et al. Subacute decline in serum lipids precedes the occurrence of primary intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2016;86(22):2034–41.
402. Kulminski AM, Raghavachari N, Arbeevev KG, Culminkaya I, Arbeevev L, Wu D, et al. Protective role of the apolipoprotein E2 allele in age-related disease traits and survival: evidence from the Long Life Family Study. *Biogerontology*. 2016;17(5–6):893–905.
403. Konishi M, Iso H, Komachi Y, Iida M, Shimamoto T, Jacobs DR, et al. Associations of serum total cholesterol, different types of stroke, and stenosis distribution of cerebral arteries: The akita pathology study. *Stroke*. 1993;24(7):954–64.
404. Lei C, Wu B, Liu M, Chen Y. Association between statin use and intracerebral hemorrhage: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol*. 2014;21(2):192–8.
405. Wang N, Tall AR. Blood Spotlight Cholesterol in platelet biogenesis and activation. *Blood*. 2016;127(16):1949–53.
406. Anstey KJ, Ashby-mitchell K, Peters R. Updating the Evidence on the Association between Serum Cholesterol and Risk of Late-Life Dementia : Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;56:215–28.

407. Gamba P, Testa G, Gargiulo S, Staurengi E, Poli G, Leonarduzzi G. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2015;7(JUN).
408. Florea G, Tudorache IF, Fuior EV, Ionita R, Dumitrescu M, Fenyo IM, et al. Apolipoprotein A-II, a Player in Multiple Processes and Diseases. *Biomedicines.* 2022 Jul 1;10(7).
409. Song HB, Jun HO, Kim JH, Yu YS, Kim KW, Min BH, et al. Anti-apoptotic effect of clusterin on cisplatin-induced cell death of retinoblastoma cells. *Oncol Rep.* 2013;30(6):2713–8.
410. Xu C, Garcia D, Lu Y, Ozuna K, Adjeroh DA, Wang K. Levels of angiotensin-converting enzyme and apolipoproteins are associated with alzheimer's disease and cardiovascular diseases. *Cells.* 2022 Jan 1;11(1).
411. Lehallier B, Essioux L, Gayan J, Alexandridis R, Nikolcheva T, Wyss-Coray T, et al. Combined plasma and cerebrospinal fluid signature for the prediction of midterm progression from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 2016 Feb 1;73(2):203–12.
412. Koch M, DeKosky ST, Goodman M, Sun J, Furtado JD, Fitzpatrick A, et al. High-density lipoprotein and its apolipoprotein-defined subspecies and risk of dementia. *J Lipid Res.* 2020;61(3):445–54.
413. Jin JL, Guo YL, Li JJ. Apoprotein C-III: A review of its clinical implications. *Clinica Chimica Acta.* 2016;460:50–4.
414. Lee HC, Akhmedov A, Chen CH. Spotlight on very-low-density lipoprotein as a driver of cardiometabolic disorders: Implications for disease progression and mechanistic insights. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Oct 4;9.
415. Jensen M k, Aroner AA, Mukamal KJ, Furtado JD, Post WS, Tsai MY, et al. HDL subspecies defined by presence of apolipoprotein C-III and incident coronary heart disease in four cohorts. *Circulation.* 2018;137(13):1364–73.
416. Morton AM, Koch M, Mendivil CO, Furtado JD, Tjønneland A, Overvad K, et al. Apolipoproteins E and CIII interact to regulate HDL metabolism and coronary heart disease risk. *JCI Insight.* 2018;3(4):1–20.
417. Calero M, Tokuda T, Rostagno A, Kumar A, Zlokovic B, Frangione B, et al. Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin). *Biochemical Journal.* 1999;344(2):375–83.
418. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko A v., Orekhov AN. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.
419. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions.* 2018;4:575–90.

420. Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly D, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology*. 1996 Jun;46(6):1592–6.
421. Wojtas AM, Carlomagno Y, Sens JP, Kang SS, Jensen TD, Kurti A, et al. Clusterin ameliorates tau pathology in vivo by inhibiting fibril formation. *Acta Neuropathol Commun*. 2020 Dec 1;8(1):1–11.
422. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, et al. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999;46(6):860–6.
423. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease—one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(1):30–42.
424. Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC, Sheng M. TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron*. 2016 Jul 20;91(2):328–40.
425. Man SM, Ma YR, Shang DS, Zhao WD, Li B, Guo DW, et al. Peripheral T cells overexpress MIP-1 α to enhance its transendothelial migration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007 Apr;28(4):485–96.
426. Zhang K, Tian L, Liu L, Feng Y, Dong Y bin, Li B, et al. CXCL1 Contributes to β -Amyloid-Induced Transendothelial Migration of Monocytes in Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2013;8(8):1–13.
427. Tschoe C, Bushnell CD, Duncan PW, Alexander-Miller MA, Wolfe SQ. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets. *J Stroke*. 2020 Jan 1;22(1):29–46.
428. Jeong S, Ledee DR, Gordon GM, Itakura T, Patel N, Martin A, et al. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation. *American Journal of Pathology*. 2012 May;180(5):2028–39.
429. Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, et al. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(12):6691–7.
430. Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, Solomon A, Selzer MG, Lokeshwar BL, et al. Regulation of MMP-9 Activity in Human Tear Fluid and Corneal Epithelial Culture Supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(7):1703–9.
431. Zhao L, Arbel-Ornath M, Wang X, Betensky RA, Greenberg SM, Frosch MP, et al. Matrix metalloproteinase 9-mediated intracerebral hemorrhage induced by cerebral amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging*. 2015 Nov 1;36(11):2963–71.

432. Montaner J, Ramiro L, Simats A, Hernández-Guillamon M, Delgado P, Bustamante A, et al. Matrix metalloproteinases and ADAMs in stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019 Aug 1;76(16):3117–40.
433. Chelluboina B, Klopfenstein JD, Pinson DM, Wang DZ, Vemuganti R, Veeravalli KK. Matrix metalloproteinase-12 induces blood-brain barrier damage after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2015;46(12):3523–31.
434. Power C, Henry S, del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol*. 2003;53(6):731–42.
435. Wells JEA, Biernaskie J, Szymanska A, Larsen PH, Yong VW, Corbett D. Matrix metalloproteinase (MMP)-12 expression has a negative impact on sensorimotor function following intracerebral haemorrhage in mice. *European Journal of Neuroscience*. 2005;21(1):187–96.
436. Ito S, Kimura K, Haneda M, Ishida Y, Sawada M, Isobe K ichi. Induction of matrix metalloproteinases (MMP3, MMP12 and MMP13) expression in the microglia by amyloid- β stimulation via the PI3K/Akt pathway. *Exp Gerontol*. 2007 Jun;42(6):532–7.
437. Chelluboina B, Nalamolu KR, Klopfenstein JD, Pinson DM, Wang DZ, Vemuganti R, et al. MMP-12, a Promising Therapeutic Target for Neurological Diseases. Vol. 55, *Molecular Neurobiology*. 2018. p. 1405–9.

Annexes



Carrera científica de la doctoranda

Formació acadèmica

- **Doctorat en Neurociències** - Universitat Autònoma de Barcelona, Espanya (2018-actualitat)
- **Màster en investigació biomèdica translacional** - Universitat Autònoma de Barcelona, Espanya (2017-2018)
- **Grau en ciències biomèdiques** - Universitat de Barcelona, Espanya (2013-2017)

Publicacions - ORCID: 0000-0002-1480-622X

- Marazuela, P.; Paez-Montserrat, B.; **Bonaterro-Pastra, A.**; Solé, M.; Hernández-Guillamon, M. Impact of Cerebral Amyloid Angiopathy in Two Transgenic Mouse Models of Cerebral β -Amyloidosis: A Neuropathological Study. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 4972. doi.org/10.3390/ijms23094972
- Marazuela P, Solé M, **Bonaterro-Pastra A**, Pizarro J, Camacho J, Martínez-Sáez E, et al. MFG-E8 (LACTADHERIN): a novel marker associated with cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):154. doi: 10.1186/s40478-021-01257-9
- Camacho J, Rábano A, Marazuela P, **Bonaterro-Pastra A**, Serna G, Moliné T, et al. Association of CD2AP neuronal deposits with Braak neurofibrillary stage in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2021;e13016. doi: 10.1111/bpa.13016
- Marazuela P, **Bonaterro-Pastra A**, Faura J, Penalba A, Pizarro J, Pancorbo O, et al. Circulating AQP4 Levels in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy-Associated Intracerebral Hemorrhage. *J Clin Med.* 2021;10(5):989. doi: 10.3390/jcm10050989
- **Bonaterro-Pastra A**, Fernández-De-retana S, Rivas-Urbina A, Puig N, Benítez S, Pancorbo O, et al. Comparison of plasma lipoprotein composition and function in cerebral amyloid angiopathy and alzheimer's disease. *Biomedicines.* 2021;9(1):72. doi: 10.3390/biomedicines9010072

- Wiersma VI, van Ziel M, Vazquez-Sanchez S, Nölle A, Berenjano-Correa E, **Bonaterro-Pastra A**, et al. Neuron-selective induction of granulovacuolar degeneration bodies: A lysosomal stress response to tau aggregation? *Alzheimer's Dement.* 2020;16(S2). doi: 10.1002/alz.039378
- Navarro-Oviedo M, Muñoz-Arrondo R, Zandio B, Marta-Enguita J, **Bonaterro-Pastra A**, Rodríguez JA, et al. Circulating TIMP-1 is associated with hematoma volume in patients with spontaneous intracranial hemorrhage. *Sci Rep.* 2020;10(1):10329. doi: 10.1038/s41598-020-67250-9
- Wiersma VI, van Ziel AM, Vazquez-Sanchez S, Nölle A, Berenjano-Correa E, **Bonaterro-Pastra A**, et al. Granulovacuolar degeneration bodies are neuron-selective lysosomal structures induced by intracellular tau pathology. *Acta Neuropathol.* 2019;138(6):943–970. doi: 10.1007/s00401-019-02046-4
- De Retana SF, Marazuela P, Solé M, Colell G, **Bonaterro A**, Sánchez-Quesada JL, et al. Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin modulates brain beta-amyloid levels in APP23 mice. *Alzheimer's Res Ther.* 2019;11(1):1–17. doi: 10.1186/s13195-019-0498-8
- Camacho J, Moliné T, **Bonaterro-Pastra A**, Cajal SRY, Martínez-Sáez E, Hernández-Guillamon M. Brain ApoA-I, ApoJ and ApoE immunodetection in cerebral amyloid angiopathy. *Front Neurol.* 2019;10(187):1–12. doi: 10.3389/fneur.2019.00187

Projectes

- RICORS-ICTUS. Instituto de Salud Carlos III. Anna Rossell Novel. 2022-2024. Membre de l'equip.
- Implication of proteins associated with vascular beta-amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. Instituto de Salud Carlos III. Mar Hernández Guillamon. 2021-2023. 169.000 €. Membre de l'equip.
- Nanotechnology albumin-based approach for the diagnosis and future treatment of Alzheimer's Disease. Albus Program – Grifols. Mar Hernández Guillamon. 2021-2021. 50.000 €. Membre de l'equip.
- Proyecto. Therapeutic effect of rApoA-I-Milano in an AD model. Mar Hernández Guillamon. 2017-2021. 300.000 €. Membre de l'equip.

- Estudio de la implicación de la distribución de la apolipoproteína J (ApoJ/Clusterin) en lipoproteínas circulantes en la Angiopatía Amiloide Cerebral. Instituto de Salud Carlos III. Mar Hernández Guillamon. 2018-2020. 110.000 €. Membre de l'equip.
- Therapeutic impact of ApoJ/Clusterin-coupled liposomes on Alzheimer's disease experimental models. Mar Hernández Guillamon. 2015-2017. 200.000 €. Membre de l'equip.

Congressos

- **International CAA Conference.** Presentació oral de “The presence of circulating human ApoJ reduces the occurrence of cerebral microbleeds in APP23 mice”. Online, novembre 2022
- **15ª jornada científica de l'institut de recerca de l'Hospital Universitari Vall d'hebron.** Presentació en format pòster “The presence of circulating human recombinant apoJ decreases the occurrence of cerebral microbleeds in a cerebral amyloid angiopathy transgenic mouse model.” Desembre 2021. Premiat a millor pòster en la categoria predoctoral.
- **15th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD 2021)** Presentació en format pòster “Effect of peripheral administration of human recombinant Apoj on the occurrence of cerebral microbleeds in APP23 mice.” Online, març 2021.
- **Jornades de neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.** Presentació oral “The implication of Apolipoprotein J (ApoJ) in Cerebral Amyloid Angiopathy.” Octubre 2020.
- **International CAA Online Conference.** Assistència online, setembre 2020.

Cursos

- **Bioinformatics for Biologists: Linux, Bash; scripting, and R (2021).** FutureLearn.
- **Curs de bona pràctica clínica (BPC) en investigació (2020).** Hospital Vall d'Hebron.

- **Curs de Formació de personal investigador usuari d'animals per experimentació i altres finalitats científiques (funcions A, B, C, D) (2018).**
Universitat Autònoma de Barcelona, FELASA.

