





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

Barcelona 2021

BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES EN LA ANGIOPATÍA AMILOIDE CEREBRAL

PAULA MARAZUELA FUENTES

Programa de Doctorado en Neurociencias

Universitat Autònoma de Barcelona

Institut de Neurociències

Vall d'Hebron Institut de Recerca

Directora:

Dra. Mar Hernández Guillamon

Tutor:

Dr. Joan Montaner

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Laboratorio de Investigación Neurovascular del Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron (VHIR). Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI17/00275 y PI20/00465), cofinanciado por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) y con el soporte de una beca predoctoral del VHIR otorgada a Paula Marazuela Fuentes. El Laboratorio de Investigación Neurovascular pertenece a la red INVICTUS+ (RD16/0019/0021).

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	17
1. β-amiloidosis cerebral	19
1.1 Péptido A β	19
1.2 Fisiopatología de la β -amiloidosis cerebral	20
2. Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC)	24
2.1 Aspectos clínicos	24
2.2 Características patológicas	26
2.3 Incidencia y prevalencia	28
2.4 Diagnóstico	28
2.5 Tratamiento	30
3. Biomarcadores en la AAC	32
3.1 Marcadores de neuroimagen.....	32
3.2 Marcadores biológicos.....	34
3.3 Marcadores genéticos	35
4. Enfermedad de Alzheimer (EA)	36
4.1 Aspectos clínicos	36
4.2 Características patológicas	37
4.2.1 Placas neuríticas	38
4.2.2 Ovillos neurofibrilares	39
4.3 Incidencia y prevalencia	39
4.4 Diagnóstico y biomarcadores	40
4.5 Tratamiento	41

5. Principales diferencias e interacciones entre la AAC y EA	43
6. Modelos animales de β-amiloidosis cerebral	47
6.1 Modelos transgénicos para el estudio de la AAC.....	48
6.2 Modelo APP23.....	50
6.3 Modelo 5xFAD	51
OBJETIVOS	53
MÉTODOS.....	57
1. Modelos animales.....	59
1.1 Línea de ratones transgénicos APP23.....	59
1.2 Línea de ratones 5xFAD.....	59
1.3 Mantenimiento de las colonias	59
1.4 Seguimiento de las colonias para el análisis de supervivencia	60
1.5 Preparación de muestras ratón para análisis bioquímicos e histológicos.....	60
1.6 Preparación de homogenados cerebrales de ratón	60
1.7 Microdissección láser y proteómica en muestras de cerebro de ratón	61
1.8 Análisis de imagen <i>ex vivo</i> por RM	61
2. Estudio de muestras de suero humano: AAC-HIC, EA y controles	62
2.1 Muestras de suero de pacientes AAC-HIC.....	62
2.2 Muestras de suero de pacientes con EA.....	64
2.3 Muestras de suero de sujetos control.....	64
3. Estudio de muestras de LCR humano: AAC, EA y controles	65
3.1 Muestras de pacientes con AAC	65
3.2 Muestras de pacientes con EA.....	65
3.3 Muestras de controles	65
4. Estudio de muestras cerebrales <i>post mortem</i> de AAC y controles	66
5. Cultivos celulares	66

5.1 Mantenimiento del cultivo celular	66
5.2 Subcultivo	67
5.3 Almacenaje de células (congelación y descongelación)	67
5.4 Tratamientos de las células.....	67
5.4.1 Tratamiento con A β 40 y A β 40-Dutch	68
5.4.2 Tratamiento con rh-MFGE8.....	68
5.5 Silenciamiento con siRNA MFGE8.....	68
5.6 Obtención de muestras y viabilidad de los cultivos celulares	69
5.6.1 Preparación de lisados celulares.....	69
5.6.2 Viabilidad celular	69
6. Métodos generales	69
6.1 Tinción con ThS.....	69
6.2 Tinción con Resorufina	70
6.3 Tinción con Lectina.....	70
6.4 Tinción de Prussian Blue.....	71
6.5 Inmunohistoquímica	71
6.6 Inmunofluorescencia	72
6.7 Inmunocitoquímica	73
6.8 Western blot	73
6.9 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	74
6.10 PCR cuantitativa.....	74
7. Análisis estadísticos	75
RESULTADOS	77
1. Impact of Cerebral Amyloid Angiopathy in Two Preclinical Mice Models of Cerebral β-Amyloidosis: A Neuropathological Study	79
2. Lactadherin (MFG-E8): A Novel Marker Associated with Cerebral Amyloid Angiopathy.....	107

3. Circulating AQP4 Levels in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy-Associated Intracerebral Hemorrhage	147
DISCUSIÓN	165
1. Importancia de la caracterización de los modelos animales	168
1.1 Influencia del sexo y genotipo la supervivencia de los animales	169
1.2 Evolución del depósito β -amiloide parenquimatoso y su relación con el genotipo y el sexo.....	170
1.3 Evolución del depósito β -amiloide en la vasculatura cerebral y su relación con el genotipo y el sexo	171
1.4 Estudio del fenotipo clínico de AAC en los modelos experimentales	173
2. Búsqueda de biomarcadores asociados a la AAC.....	174
2.1 Expresión de MFG-E8 en la AAC.....	175
2.2 Niveles de MFG-E8 circulante	176
2.3 Implicación funcional de MFG-E8 en la AAC	178
3. Papel de la AQP4 en la AAC asociada a HIC	179
3.1 ¿Es la AQP4 un biomarcador indicativo de AAC-HIC?.....	179
3.2 AQP4 y carga hemorrágica en la AAC-HIC.....	181
3.3 AQP4 en el pronóstico del resultado funcional tras una HIC	181
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	187

RESUMEN

La β -amiloidosis cerebral se caracteriza por la acumulación anómala del péptido beta amiloide ($A\beta$) en el parénquima y en la pared de los vasos cerebrales, constituyendo una de las principales características neuropatológicas de la Enfermedad de Alzheimer (EA) y de la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC), respectivamente. Aunque en ambas patologías se observan depósitos de $A\beta$, la localización de los mismos difiere entre ellas, implicando diferentes presentaciones clínicas. No existen hasta la fecha marcadores biológicos que nos permitan identificar pacientes con AAC o predecir su evolución en la práctica clínica. Por ello, el objetivo principal de esta tesis se centra en la búsqueda de nuevos biomarcadores involucrados en el proceso de acumulación vascular de $A\beta$ que nos puedan ayudar a mejorar el diagnóstico y pronóstico de la AAC, y a comprender mejor la fisiopatología que engloba la β -amiloidosis cerebral.

La primera parte de la tesis se centró en la caracterización de dos modelos de ratones transgénicos de β -amiloidosis cerebral, el APP23 y el 5xFAD, en términos neuropatológicos de AAC. En este contexto, confirmamos que la patología de AAC era más abundante en el modelo APP23, observando una mayor progresión de vasos $A\beta$ positivos con la edad y detectando microhemorragias cerebrales por resonancia magnética, por lo que fue el modelo utilizado para abordar el siguiente objetivo. A continuación, utilizamos un enfoque de microdissección laser combinado con espectrometría de masas para la identificación de proteínas vasculares asociadas a $A\beta$ en cerebros de ratones APP23. Nos centramos en el estudio de una de las principales proteínas detectadas, MFG-E8 (del inglés, *Milk Fat Globule-EGF factor 8*), y validamos su localización en cerebros de ratones APP23 y en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con AAC, donde confirmamos que MFG-E8 estaba ausente en placas neuríticas y su presencia era elevada en vasos cerebrales positivos para $A\beta$. Además, analizamos los niveles circulantes de esta proteína en el suero y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de una cohorte de pacientes con AAC, EA y controles. No encontramos diferencias en los niveles séricos de MFG-E8 entre los grupos. Sin embargo, los niveles de MFG-E8 en el LCR de pacientes con AAC fueron significativamente más bajos que en el resto de grupos, y los niveles de $A\beta$ en LCR se correlacionaron positivamente con los niveles de MFG-E8 en toda la cohorte. Al evaluar la implicación de la modulación de MFG-E8 en células vasculares del músculo liso

humanas *in vitro*, encontramos que niveles elevados de MFG-E8 eran protectores frente a la toxicidad inducida por el péptido A β 40 conteniendo la mutación familiar E693Q (A β 40-*Dutch*), demostrando la asociación de MFG-E8 con la patología AAC.

Por último, en un tercer estudio, evaluamos los niveles circulantes de AQP4 (aquoporina-4) en el suero de una cohorte de pacientes que había sufrido una hemorragia intracerebral (HIC) con un diagnóstico clínico de AAC y analizamos su posible asociación con las principales características radiológicas de AAC. La AQP4 se había asociado anteriormente a la EA y a la AAC por ser una de las principales proteínas involucradas en la eliminación de solutos intersticiales del cerebro a través del sistema glinfático, pero nunca antes se había estudiado en el suero de estos pacientes. Aunque no encontramos diferencias en los niveles circulantes de AQP4 entre los pacientes con AAC-HIC y los controles, observamos una asociación negativa entre la concentración de AQP4 y la carga hemorrágica en la cohorte de AAC-HIC. Nuestros resultados sugirieron también que la determinación de AQP4 sérica podría predecir el resultado funcional a largo plazo en pacientes con AAC tras una HIC lobar.

En resumen, consideramos que esta tesis doctoral ha permitido caracterizar un modelo experimental válido de AAC y proponer nuevos marcadores que podrían ayudar a mejorar el diagnóstico de la AAC y contribuir a la comprensión de la fisiopatología de la β -amiloidosis cerebral.

ABSTRACT

Cerebral β -amyloidosis is characterized by parenchymal and vascular deposition of amyloid beta-peptide ($A\beta$), which are major features of Alzheimer's disease (AD) and Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA), respectively. Although $A\beta$ is accumulated in both pathologies, the localization differs between them, involving different clinical presentations. To date, there are no biological markers that identify CAA patients or predict their evolution in clinical practice. Thus, the main objective of this thesis is to find out new biomarkers related to vascular $A\beta$ accumulation that might improve the diagnosis and prognosis of CAA and help to understand the pathophysiology of cerebral β -amyloidosis.

The first part of the thesis focused on the characterization of two transgenic mice models of cerebral β -amyloidosis, APP23 and 5xFAD transgenic mice, in terms of neuropathological features of CAA. In this context, we confirmed that CAA pathology was more prominent in the APP23 model, observing a higher progression of $A\beta$ -positive vessels with age and detecting cerebral microbleeds by magnetic resonance imaging. Thus, this was the model used to address the following objective of this thesis. Next, we used a laser microdissection approach combined with mass spectrometry to identify $A\beta$ -associated vascular proteins in the brains of APP23 mice. We focused on the study of one of the main proteins detected in old APP23 mouse brains, MFG-E8 (Milk Fat Globule-EGF factor 8), and we validated its localization in APP23 mouse brains and in *post mortem* brain tissue of CAA patients, where we confirmed that MFG-E8 was absent in neuritic plaques and its presence was strongly detected in $A\beta$ -positive cerebral vessels. We also analyzed the circulating levels of this protein in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of a cohort of patients with CAA, AD and controls. No differences in MFG-E8 serum levels were found between the diagnostic groups. However, MFG-E8 levels were significantly lower in the CSF of CAA patients than all the groups studied and the levels of $A\beta$ in the CSF were positively correlated with the levels of MFG-E8 in the total cohort. When evaluating the involvement of MFG-E8 modulation in human vascular smooth muscle cells *in vitro*, we found that increased levels of MFG-E8 were protective against the toxicity induced by the $A\beta_{40}$ peptide containing the familial E693Q ($A\beta_{40}$ -Dutch) mutation, demonstrating the association of MFG-E8 with CAA pathology.

Finally, in a third study, we evaluated the circulating levels of AQP4 (aquaporin-4) in the serum of a cohort of patients who had suffered an intracerebral hemorrhage (ICH) with a clinical diagnosis of CAA and we analyzed its potential association with the main neuroimaging hallmarks of CAA. AQP4 had previously been associated with AD and CAA as one of the main proteins involved in the clearance of interstitial solutes from the brain through the glymphatic system, however, no studies had reported the modulation of AQP4 in the circulation of CAA patients. Although no differences were found in AQP4 serum levels between CAA-ICH and controls, we observed a negative association between circulating AQP4 concentration and specific hemorrhagic neuroimaging features in the CAA-ICH cohort. Furthermore, our results suggested that AQP4 could potentially predict a long-term functional outcome in patients presenting with lobar ICH.

In summary, we consider that this doctoral thesis allowed the characterization of a valid experimental model for CAA and highlighted new markers that could help improve the diagnosis of CAA and provide valuable insights for the understanding of cerebral β -amyloidosis pathophysiology.

ABREVIATURAS

A β : β -amiloide

A β 40: Péptido A β de 40 aminoácidos

A β 42: Péptido A β de 42 aminoácidos

A β 40-D: Péptido A β de 40 aminoácidos *Dutch* E693Q

AAC: Angiopatía Amiloide Cerebral

AAC-HIC: Hemorragia Intracerebral asociada a Angiopatía Amiloide Cerebral

AAC-SVDB: Carga total de enfermedad de pequeño vaso para AAC, *Small Vessel Disease Burden*

ACE: enzima convertidora de angiotensina, *Angiotensin-Converting Enzyme*

ANOVA: Análisis de varianza de un factor

APH-1: del inglés, *Anterior Pharynx defective-1*

APOE: Apolipoproteína E

APOJ: Apolipoproteína J

AQP4: Acuoporina-4

ARIA: Anormalidades de imagen asociadas a amiloide, *Amyloid-Related Imaging Abnormalities*

BHE: Barrera hematoencefálica

BSA: Albúmina de suero bovino, *Bovine Serum Albumin*

C83/99: Fragmentos C-terminales de 83 y 99 aminoácidos

COL6A2: Cadena α -2 (VI) de colágeno

CR1: Receptor del complemento 1, *Complement Receptor 1*

CSO: Centro semioval

cSS: Siderosis superficial cortical, *cortical Superficial Siderosis*

DAB: Diaminobencidina

DCIP: Dominio intracelular de la proteína precursora amiloide

DMEM: del inglés, *Dulbecco-Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EA: Enfermedad de Alzheimer

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

EPVD: Espacios perivasculares dilatados

FBS: Suero bovino fetal, *fetal bovine serum*

FLAIR: Recuperación de inversión atenuada de fluido

HBVSMC: Células del músculo liso de la vasculatura cerebral humana, *Human Brain Vascular Smooth Muscle Cells*

HCHWA: Hemorragia intracerebral hereditaria con amyloidosis, *Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis*

HIC: Hemorragia Intracerebral

HRP: Peroxidasa, *Horseradish Peroxidase*

HTA: Hipertensión arterial

IDE: Enzima degradadora de insulina, *Insulin-Degrading Enzyme*

IPAD: Vía de drenaje peri-arterial intramural, *Intramural Periarterial Drainage*

INR: Índice internacional normalizado, *International Normalized Ratio*

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LI: Líquido Intersticial

LRP1/LRP2: Lipoproteína de baja densidad-1 o -2, *Lipoprotein Receptor Protein-1 or -2*

LSB: Lesiones de la Sustancia Blanca

MFG-E8: del inglés, *Milk Fat Globule-EGF factor 8*

MMP: Metaloproteinasas de Matriz

MSC: Microsangrados Cerebrales

MTT: 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolo

NEP: Neprilisina

NT-siRNA: ARNs de Interferencia no codificante, *Non-targeting small interfering RNA*

PBS: Tampón fosfato salino, *Phosphate Buffered Saline*

PBST: Tampón fosfato salino suplementado con TritónX-100

PEN-2: Potenciador de presenilina 2, *Presenilin Enhancer 2*

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

PFA: Paraformaldehído

PiB: Compuesto de Pittsburgh-B, *Pittsburgh Compound B*

PPA: Proteína Precursora Amiloide

PPIA: Peptidilprolil Isomerasa A

PS1/2: Presenilinas 1 y 2

RAGE: Receptor de productos de glicosilación avanzada, *Receptor for Advanced Glycation End-products*

RM: Resonancia Magnética

RT-qPCR: PCR cuantitativa, *Real-Time PCR*

SD: Síndrome de Down

siRNA: ARNs de Interferencia de cadena corta, *small interfering RNA*

SMA: Actina del músculo liso, *Smooth Muscle Actin*

SNC: Sistema Nervioso Central

sPPA α/β : Fragmentos solubles de la Proteína Precursora Amiloide α - y β -

SRPX1: del inglés, *Sushi Repeat-Containing Protein 1*

TC: Tomografía Computarizada

TCE: Traumatismo Craneoencefálico

TBS: Solución salina tamponada con tris, *Tris Buffered Saline*

TBST: Solución salina tamponada con tris suplementado con TritonX-100

TIMP3: Inhibidor de la metaloproteinasas 3

ThS: Thioflavina S

WT: Tipo salvaje, *Wild-Type*

INTRODUCCIÓN

1. β -amiloidosis cerebral

La amiloidosis es una enfermedad que se define por la acumulación anómala en forma de depósitos de la proteína amiloide. Existen diferentes tipos de amiloidosis en función de la proteína que se deposite, y puede afectar de manera sistémica a varios órganos, o de manera localizada a una parte específica del cuerpo¹.

La β -amiloidosis cerebral se caracteriza por la acumulación de la proteína β -amiloide ($A\beta$) en el cerebro. Estos depósitos de $A\beta$ son uno de los hallazgos principales tanto en la Enfermedad de Alzheimer (EA), donde se observan depósitos insolubles de $A\beta$ en el parénquima cerebral, como en la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC), donde el $A\beta$ se deposita específicamente en los vasos sanguíneos cerebrales.

1.1 Péptido $A\beta$

El péptido $A\beta$ se genera a partir del procesamiento de la proteína precursora amiloide (PPA). La PPA es una glicoproteína de membrana que posee un gran dominio extracelular, una región transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático. La función fisiológica de esta proteína sigue siendo objeto de estudio, aunque se ha sugerido su implicación en diferentes procesos, como la homeostasis neuronal, el desarrollo neuronal, la sinaptogénesis, la señalización, el transporte intracelular o en procesos de adhesión celular². El procesamiento de la PPA ocurre de manera secuencial por dos vías diferentes: la vía no amiloidogénica o la vía amiloidogénica, siendo la vía no amiloidogénica la que tiene lugar en condiciones fisiológicas³.

En la vía no amiloidogénica, la PPA es procesada por la α secretasa, generando un fragmento N-terminal soluble (sPPA α) que es liberado al medio extracelular y un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos (C83) que se queda anclado a la membrana.

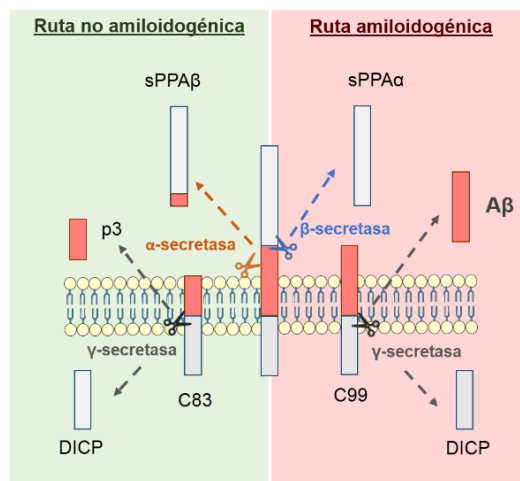


Figura 1. Representación esquemática del procesamiento de PPA por la vía amiloidogénica y no amiloidogénica. PPA: proteína precursora amiloide; sPPA α y sPPA β : fracciones solubles de PPA α y β ; C83 y C99: fragmentos C-terminales de 83 y 99 aminoácidos; $A\beta$: péptido β -amiloide; DICP: dominio intracelular citosólico de PPA. Modificado de LaFerla *et al.*, 2007⁴.

En la vía amiloidogénica, la PPA es procesada por la β -secretasa, liberando un fragmento N-terminal soluble (sPPA β) y dejando anclado a la membrana un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99). Una segunda enzima, la γ -secretasa, un complejo enzimático formado por las proteínas presenilinas 1 o 2 (PS1 o PS2), APH-1 (*del inglés, anterior pharynx defective-1*), Nicastrina y PEN-2 (*del inglés, presenilin enhancer 2*), hidroliza los fragmentos C83 y C99 liberando al espacio extracelular un pequeño péptido soluble denominado p3, en el caso de C83 (vía no amiloidogénica), y el péptido A β insoluble en el caso de C99 (vía amiloidogénica) (Figura 1). Además, en ambas rutas se libera al citosol un dominio intracelular de PPA⁴.

Los monómeros de A β se agregan generando oligómeros y fibras insolubles que tienden a depositarse. Es importante mencionar que el lugar de escisión de la γ -secretasa es impreciso, generando péptidos de A β de diferente longitud que varían entre 36 y 43 aminoácidos. Sin embargo, los péptidos A β de 40 aminoácidos (A β 40) son los más abundantes, y son los que más interés clínico han despertado junto con los de 42 aminoácidos (A β 42) por su papel en la β -amiloidosis cerebral; el A β 40 es el componente mayoritario de los depósitos amiloide en las paredes de los vasos cerebrales característicos de la AAC, mientras que el A β 42 es más prominente en las placas neuríticas presentes en la EA^{5,6}.

1.2 Fisiopatología de la β -amiloidosis cerebral

A pesar del papel central del A β en la patología, se sigue sin conocer en profundidad su función fisiológica y sigue bajo investigación, aunque los estudios desarrollados en modelos animales han demostrado que la mayor parte del A β tiene origen neuronal^{7,8}. En condiciones fisiológicas la PPA se procesa mayoritariamente por la ruta no amiloidogénica, y el A β es eficazmente degradado y liberado al líquido extracelular por diferentes mecanismos, entre los que se encuentra la degradación enzimática, la fagocitosis, el transporte activo a través de la barrera hematoencefálica (BHE) o el drenaje perivascular (Figura 2)⁹⁻¹¹. Por ello, la teoría más aceptada hasta el momento es que la alteración de uno o varios de estos mecanismos es lo que daría lugar a un desequilibrio entre la producción y eliminación del A β y lo que conduciría a su depósito en el parénquima cerebral y/o en las paredes de los vasos generando un daño neuronal y desarrollando así EA y AAC esporádica^{9,11-13}.

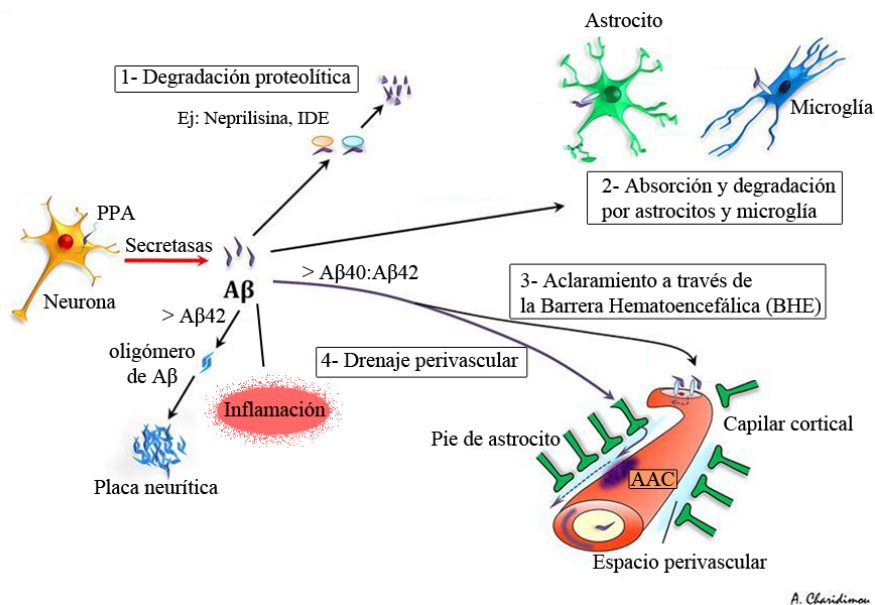


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de eliminación de A β . Modificado de Charidimou *et al.*, 2012¹⁴.

Uno de los mecanismos de eliminación de A β es la degradación proteolítica por enzimas específicas como la neprilisina (NEP) o la enzima encargada de degradar la insulina (IDE, *del inglés, insulin-degrading enzyme*)¹⁵. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la ausencia de estas enzimas contribuye a un aumento en la acumulación de A β en el cerebro^{9,16,17}. Además se ha visto que los niveles de estas enzimas están disminuidos en los cerebros de pacientes con EA¹⁸. Del mismo modo, también se ha descrito que algunas metaloproteinasas de matriz (MMP) son capaces de procesar y degradar los agregados de A β , como la MMP-2 o MMP-9¹⁹. Otra de las rutas ampliamente conocidas es la mediada por la microglia y los astrocitos²⁰. Estos tipos celulares son capaces de internalizar el A β mediante fagocitosis y endocitosis a través de diferentes receptores y promover su degradación por autofagia, mediante lisosomas y endosomas y/o mediante el sistema ubiquitina-proteasoma²¹.

Por otro lado, la BHE juega un papel fundamental en la regulación del paso de metabolitos circulantes al cerebro y su alteración puede contribuir a la acumulación de moléculas neurotóxicas en el SNC²². La BHE está formada por células endoteliales, la lámina basal, pericitos y los pies de los astrocitos y se caracteriza por tener una permeabilidad selectiva. Se ha demostrado que el A β puede ser transportado de manera bidireccional a través de la BHE mediante receptores específicos^{9,10,23}. De hecho, existen

diversos receptores que participan en dicho proceso. El receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE, *del inglés, receptor for advanced glycation end-products*) facilita la entrada del A β circulante al SNC promoviendo su acumulación en el parénquima. Por el contrario, los receptores endoteliales LRP1 y LRP2 (*del inglés, lipoprotein receptor protein-1 or -2*) median el flujo de salida del A β del cerebro hacia el torrente sanguíneo. Estos receptores son capaces de unirse directamente al A β soluble o de unirse a complejos formados por A β y otras moléculas transportadoras como la apolipoproteína E (ApoE) o la apolipoproteína J (ApoJ) que también podrían intervenir en el aclaramiento de péptidos a través de las células endoteliales y los capilares cerebrales^{24,25}. Durante el envejecimiento normal y en la EA y AAC se ha observado un aumento de la expresión de RAGE^{23,26}, y una reducción en la expresión de LRP-1 en pacientes con EA^{27,28}, sugiriendo que los receptores encargados de movilizar el A β a través de la BHE se encuentran desregulados durante el proceso patológico.

Por último, uno de los mecanismos de eliminación de A β más estudiados en los últimos años es el conocido como drenaje perivascular²⁹⁻³¹. Los espacios perivasculares son espacios que rodean a las arterias y venas cerebrales desde el espacio subaracnoideo hasta el parénquima cerebral. Están rodeados de líquido cefalorraquídeo (LCR) y son una de las principales vías de eliminación de metabolitos a lo largo de las membranas basales. La vía de drenaje peri-arterial intramural (IPAD, *del inglés, intramural periarterial drainage*) sugiere que el líquido intersticial (LI) junto con otros solutos, se eliminaría a lo largo de las paredes de los capilares y las arterias, pasando por las membranas basales de las células del músculo liso y saliendo finalmente por los ganglios linfáticos cervicales adyacentes a las arterias que se encuentran en la base del cráneo (Figura 3). Aunque las funciones exactas de las vías de drenaje no se conocen por completo, la vía IPAD coincide ampliamente con la distribución de los depósitos vasculares de A β en la AAC. De hecho, esta vía de drenaje se puede debilitar con la edad, lo que podría explicar el depósito vascular de A β al no poder ser eliminado completamente a través de las arterias y capilares³².

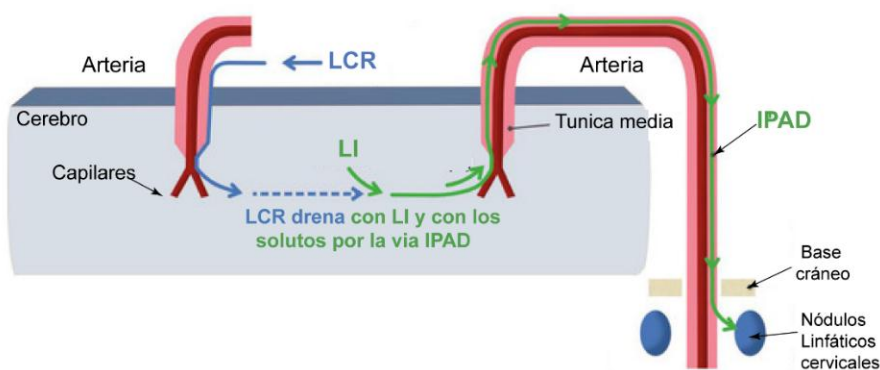


Figura 3. Representación esquemática de la vía de drenaje peri-arterial intramural (IPAD). LCR: líquido cefalorraquídeo; LI: líquido intersticial. Modificado de Carare *et al.*, 2020³²

Una ruta alternativa al drenaje perivascular del LI que se ha propuesto más recientemente es a través del sistema glinfático³³. Esta vía facilitaría el intercambio y la eliminación de solutos entre el LCR y el LI; el LCR entraría en el cerebro a través de las arterias (peri-arterial), se mezclaría con el LI y saldría del cerebro a lo largo de las venas (peri-venoso) (Figura 4)^{33,34}. Este intercambio se llevaría a cabo gracias al drenaje perivascular y a una vía de transporte astrocítico dependiente del canal de agua de acuoporina-4 (AQP4), expresada en los pies de los astrocitos que rodean la vasculatura cerebral^{34,35}. De hecho, la AQP4 ha sido objeto de estudio de esta tesis doctoral en el contexto de la AAC. En este sentido, estudios previos observaron una distribución alterada de AQP4 en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA y AAC. Wilcock *et al.*, encontraron una expresión reducida de AQP4 en pacientes con EA que presentaban AAC moderada o grave³⁶, mientras que estudios posteriores observaron un aumento de expresión en tejido cerebral de pacientes con EA y AAC en comparación con los controles³⁷⁻³⁹. Por otro lado, se ha sugerido que el patrón de expresión de AQP4 podría estar asociado a diferentes factores como la edad o la gravedad de la patología, reportando una mayor expresión en los casos más graves de AAC⁴⁰. Por tanto, debido a la implicación potencial de la AQP4 en el sistema glinfático, los últimos estudios apuntan a un posible papel de esta proteína en el aclaramiento de A β en la β -amiloidosis cerebral⁴¹⁻⁴⁴. Sin embargo, hasta la fecha, no se han estudiado los niveles circulantes de esta proteína en pacientes con AAC, y por ello ha sido uno de los objetivos a abordar en la presente tesis doctoral.

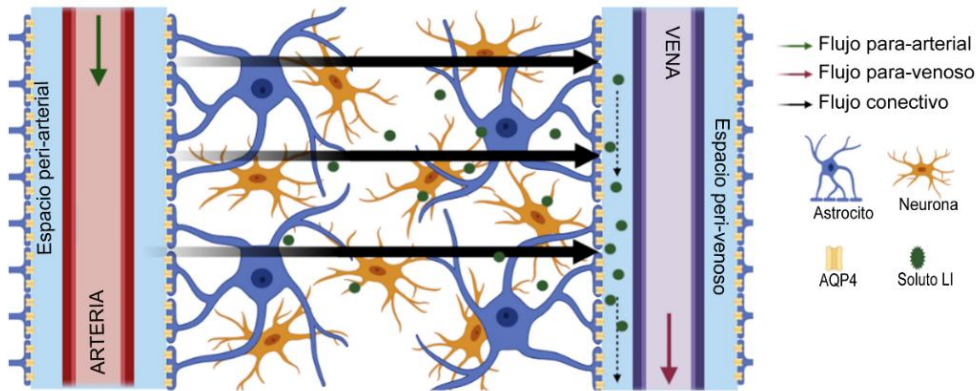


Figura 4. Representación esquemática del sistema de drenaje glinfático. LI: líquido intersticial. Modificado de Toriello *et al.*, 2021³³.

Aunque se sigue sin entender completamente la fisiopatología de la deposición de A β en los vasos cerebrales y su relación con la EA y la AAC, la identificación de nuevos mecanismos implicados en la eliminación de A β abre la puerta al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas en la β -amiloidosis cerebral.

2. Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC)

2.1 Aspectos clínicos

La AAC es una de las principales causas de hemorragia intracerebral (HIC) espontánea y la forma más común de HIC lobar en personas mayores de 55-60 años⁴⁵. La HIC no traumática se define como la extravasación aguda de sangre dentro del parénquima cerebral debido a la rotura espontánea de un vaso cerebral. La extravasación de sangre puede limitarse al parénquima o puede extenderse al espacio intraventricular o subaracnoideo⁴⁶. En función de la causa que origine el sangrado, la HIC se clasifica en primaria o secundaria. Las HIC primarias son las más frecuentes, representando el 80-85% de los casos de HIC y se deben a la rotura espontánea de los vasos afectados por hipertensión arterial (HTA) o por AAC. Por otro lado, las HIC secundarias suelen tener su origen en malformaciones vasculares, traumatismos, tumores o el uso de agentes trombolíticos en el ictus isquémico^{47,48}. Es importante destacar que aunque las HIC sólo suponen un 10-15% de todos los ictus, presentan una elevada mortalidad (\approx 50%) y morbilidad, siendo una de las primeras causas de discapacidad grave^{49,50}.

Las HIC de origen hipertensivo representan el mayor porcentaje de HIC primarias y se localizan en regiones más profundas del cerebro como los ganglios basales, el tálamo o el cerebelo⁴⁸. Por el contrario, las HIC asociadas a AAC (AAC-HIC) constituyen entre el 10-20% de las HIC primarias en personas de edad avanzada y se observan en regiones cerebrales superficiales, en la corteza cerebral, la unión cortico-subcortical y la sustancia blanca subcortical, siendo los lóbulos occipitales los más afectados. El riesgo de recurrencia hemorrágica en los pacientes con AAC-HIC es una de las principales complicaciones de esta patología, llegando a ser del 10% al año tras un primer evento hemorrágico lobar⁴⁵. Es importante destacar que además de la HIC lobar, el deterioro cognitivo y los síntomas neurológicos focales transitorios constituyen las principales manifestaciones clínicas de la AAC^{51,52}.

Aunque la mayor parte de los casos de ACC ocurren de manera esporádica asociados a la edad, también se han identificado formas familiares de AAC asociada a A β . Las formas familiares aparecen a edades más tempranas (<55 años) y presentan manifestaciones clínicas más severas. Una de las primeras mutaciones que se describieron fue la mutación holandesa (E693Q, *HCHWA-D*, del inglés, *Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis Dutch type*), que se debe a una mutación puntual en el gen PPA⁵³. Esta mutación genera una mayor acumulación de A β en la vasculatura cerebral, aunque la patología subyacente de estos depósitos es muy similar a la AAC esporádica. Lo más destacado de los pacientes con HCHWA-D son sus síntomas clínicos, manifestando HIC lobares recurrentes y demencia de inicio temprano⁵⁴. También se han descrito otras mutaciones en el mismo gen PPA, por ejemplo la mutación E693K (italiana) o E693G (ártica), que dan lugar a HIC hereditarias sin depósitos de A β en el parénquima^{55,56}. Otras mutaciones asociadas a la aparición de AAC severa son la mutación A692G (flamenca) o D694N (Iowa)^{57,58}. En la Figura 5 se muestran las mutaciones descritas en el gen PPA. Por otro lado, también se han descrito mutaciones asociadas a la EA familiar en los genes PS1 y PS2 que favorecen la aparición de AAC^{59,60}. Es importante destacar que el Síndrome de Down (SD) es un trastorno genético causado por la trisomía del cromosoma 21, donde se encuentra el gen que codifica para la PPA, y es actualmente reconocido como una forma de EA⁶¹. Las personas con SD desarrollan características neuropatológicas de EA a partir de los 40 años y es a partir de esta edad donde la prevalencia de demencia aumenta exponencialmente^{62,63}. El aumento de expresión del gen PPA también parece ser

suficiente para inducir AAC, ya que la mayoría de los exámenes *post mortem* de personas con SD mayores de 50 años muestran una AAC moderada o grave^{64,65}. Además, aunque la AAC no es un hallazgo universal en todas las personas con SD, se han identificado casos de HIC asociada a AAC en estos pacientes^{65,66}.

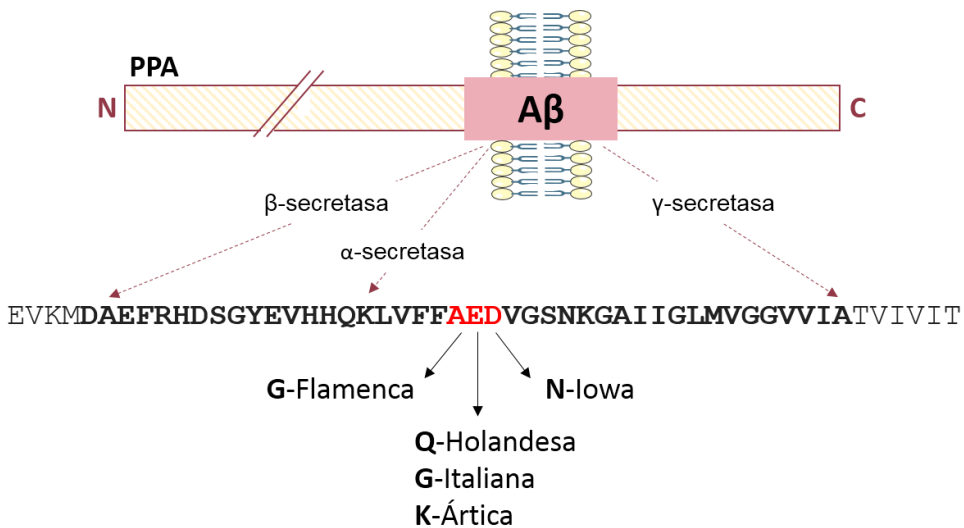


Figura 5. Representación esquemática de las mutaciones en el gen PPA que dan lugar a algunas de las formas familiares de AAC. PPA: proteína precursora amiloide. Modificado de Nilsberth *et al.*, 2001⁵⁶.

Por último, cabe mencionar que existe una condición de AAC menos común, la AAC inflamatoria, que se caracteriza por una respuesta inflamatoria vascular alrededor de los depósitos de amiloide. Estos pacientes presentan un cuadro clínico diferente que combina el deterioro cognitivo con crisis epilépticas, cefalea y déficits neurológicos focales⁶⁷.

2.2 Características patológicas

La AAC se puede clasificar en diferentes tipos en función de la proteína amiloide involucrada. Hasta ahora, se conocen siete proteínas amiloides en AAC entre las que se encuentra el Aβ, la proteína priónica, la transtiretina o la cistatina C entre otras. Dentro de estas, la forma más común de AAC es la causada por el depósito de Aβ⁶⁸.

Así, la AAC-A β (a partir de ahora AAC) se caracteriza patológicamente por el depósito de A β principalmente en la túnica media y adventicia de los vasos leptomeníngeos y corticales, arteriolas, capilares y con menor frecuencia en venas⁶⁹. Atendiendo a la gravedad de la lesión, se ha propuesto un sistema de clasificación neuropatológico de tres niveles; leve, moderado y severo^{14,70}. En la forma leve, una pequeña parte de los vasos leptomeníngeos y corticales se ven afectados, pero los cambios morfológicos son mínimos. El depósito de A β comienza en la capa externa de la túnica media, rodeando las células del músculo liso (Figura 6, A1, B1, C1). En la AAC moderada, las paredes de las arterias y arteriolas suelen estar totalmente cubiertas por A β , reemplazando las células del músculo liso (Figura 6, A2-B2). Además, el A β se deposita ocasionalmente en el parénquima cerebral adyacente al vaso afectado (Figura 6, C2). Las formas más graves de AAC se caracterizan por la degeneración de la pared del vaso, a excepción de las células endoteliales, que se suelen conservar intactas incluso en los vasos más afectados. Esta degeneración da lugar a vasos con aspecto morfológico de “doble barril” o “vaso en vaso”, debido a la delaminación y a la separación de la parte externa de la túnica media^{14,68,70}, (Figura 6, A3, B3, C3).

Aun así, a nivel de diagnóstico neuropatológico, una de las escalas más usadas para describir la severidad de la AAC es la descrita por Vonsattel et al⁷¹. Esta escala clasifica la AAC en grados (de grado 0 a grado IV) en función de las capas del vaso ocupadas por el A β , desde la ausencia de depósito (grado 0) hasta el depósito de A β en la pared del vaso causando necrosis fibrinoide (grado IV)⁷¹.

Por otro lado, según la localización del depósito de A β vascular se pueden distinguir dos subtipos de AAC: AAC tipo 1 o capilar, en la que el A β se deposita en los capilares (con o sin afectación de otros vasos); y la AAC tipo 2, en la que el depósito vascular de amiloide se restringe a las arterias corticales o leptomeníngeos, con ausencia de amiloide en los capilares⁷².

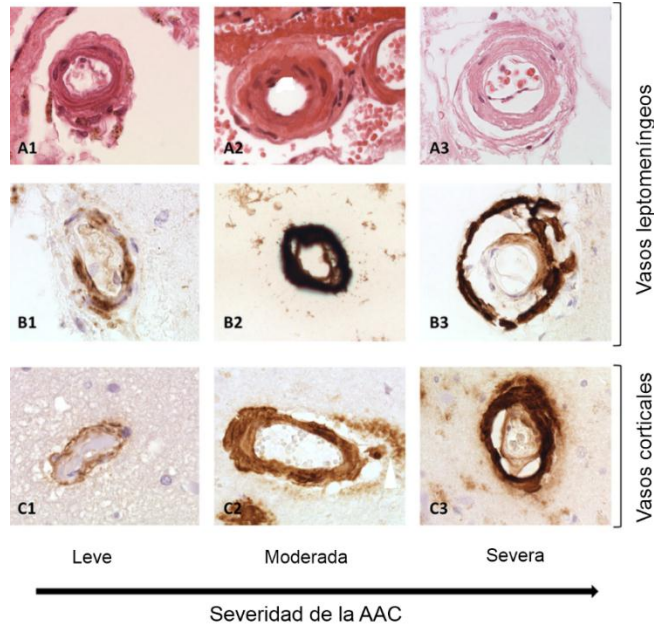


Figura 6. Características histopatológicas de la AAC. Cambios morfológicos en la pared de los vasos leptomenígeos y corticales detectados por hematoxilina-eosina (A1-A3) o mediante inmunohistoquímica contra Aβ (B1-B3; C1-C3). Modificado de Charidimou *et al.*, 2012 ¹⁴.

2.3 Incidencia y prevalencia

Es difícil determinar con exactitud la incidencia y prevalencia de la AAC esporádica ya que el diagnóstico definitivo se realiza a través de un examen histopatológico.

Sin embargo, los estudios de autopsias poblacionales han determinado que la AAC está presente en más del 60% de las personas mayores de 90 años, siendo la edad uno de los factores de riesgo más conocidos en la AAC esporádica^{14,68,73}. Además, se ha estimado que su prevalencia en la población anciana sin deterioro cognitivo es del 20-40% mientras que alcanza el 50-60% en presencia de demencia^{74,75}. También es importante destacar que esta patología aparece frecuentemente en cerebros de pacientes diagnosticados con EA, representando el 47-100% de estos pacientes, en función del estudio^{76,77}.

2.4 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de la AAC se realiza únicamente por confirmación patológica a través de una biopsia cerebral cuando se evacua el hematoma (poco frecuente), o una vez ha fallecido el paciente mediante una necropsia del tejido cerebral. Sin embargo, en

la práctica clínica se utilizan los denominados criterios de Boston para el diagnóstico no invasivo de pacientes que presentan una HIC asociada a AAC^{78,79}. Estos criterios combinan datos clínicos, signos radiológicos y hallazgos histopatológicos para establecer cuatro categorías diagnósticas. En los criterios de Boston originales, dentro de los datos clínicos se incluye la presencia de una o más HIC lobares y/o microhemorragias de localización exclusivamente lobar, cortical o cortico-subcortical⁷⁸. Sin embargo, en el año 2010, Linn y colaboradores modificaron dichos criterios incorporando el concepto de hemosiderosis cortical superficial, que hace referencia a la presencia de residuos de hemosiderina en las capas superficiales de la corteza cerebral observados por resonancia magnética (RM)⁷⁹. Con esta última modificación la sensibilidad diagnóstica de estos criterios ha aumentado de un 89.5% a un 94.7% sin modificar la especificidad de los mismos⁷⁹. Los criterios de Boston modificados se han convertido en una herramienta indispensable para la toma de decisiones en el ámbito clínico y son los que se utilizan actualmente para el diagnóstico no invasivo de AAC (Tabla 1). Sin embargo, el conocimiento de los marcadores clínicos de RM, tanto hemorrágicos como no hemorrágicos, se ha ido expandiendo en los últimos años, ofreciendo una nueva oportunidad para mejorar y refinar los criterios actuales. Es por ello por lo que, actualmente, la Asociación Internacional de AAC está llevando a cabo un esfuerzo multicéntrico para actualizar, validar y perfeccionar los criterios de Boston existentes en una nueva "versión 2.0" en el que se están incluyendo pacientes con todas las presentaciones clínicas posibles de AAC⁸⁰. Sigue siendo una prioridad en el campo de la AAC encontrar otras herramientas diagnósticas para poder identificar a los pacientes en estadios más tempranos de la enfermedad.

TABLA 1. CRITERIOS DE BOSTON MODIFICADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA AAC.
Modificado de Linn et al., 2010 ⁷⁹.

	CRITERIOS DE BOSTON MODIFICADOS
AAC DEFINITIVA	El examen <i>post mortem</i> demuestra: <ul style="list-style-type: none"> • Hemorragia lobar, cortical o subcortical • AAC con vasculopatía severa • Ausencia de otros diagnósticos
AAC PROBABLE CON CONFIRMACIÓN HISTOPATOLÓGICA	Los datos clínicos y patológicos en los tejidos (hematoma evacuado o biopsia cortical) demuestran: <ul style="list-style-type: none"> • Hemorragia lobar, cortical o subcortical • Cierta grado de AAC en la muestra • Ausencia de otros diagnósticos
AAC PROBABLE	Los datos clínicos y de RM o TC demuestran: <ul style="list-style-type: none"> • Múltiples hemorragias restringidas a región lobar, cortical o subcortical (hemorragia en el cerebelo permitida), o: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hemorragia aislada lobar, cortical o subcortical y hemosiderosis superficial focal o diseminada; ○ Edad ≥ 55 años, y ○ Ausencia de otra causa de hemorragia* o de hemosiderosis.
AAC POSIBLE	Los datos clínicos y de RM o TC demuestran: <ul style="list-style-type: none"> • Hemorragia aislada lobar, cortical o subcortical, o: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hemosiderosis superficial focal o diseminada; ○ Edad ≥ 55 años, y ○ Ausencia de otra causa de hemorragia* o de hemosiderosis.

*Otras causas de hemorragia intracerebral: sobredosificación de anticoagulantes (INR >3), antecedente de TCE, ictus isquémico, tumor del SNC, malformación vascular, vasculitis, discrasia sanguínea o coagulopatía.

AAC: angiopatía amiloide cerebral; RM: resonancia magnética; TC: tomografía computarizada; INR: índice internacional normalizado; TCE: traumatismo craneoencefálico; SNC: sistema nervioso central.

2.5 Tratamiento

A pesar del mal pronóstico de la HIC asociada a AAC, actualmente no existe un tratamiento efectivo probado. Las medidas que se adoptan son principalmente preventivas con el fin de limitar el impacto clínico de la HIC y evitar eventos hemorrágicos

recurrentes. Dentro de estas medidas se encuentra un adecuado control de la presión arterial, incluso en combinación con tratamientos antihipertensivos⁸¹, evitar el uso de estatinas y evitar el tratamiento con anticoagulantes debido al alto riesgo de recurrencia hemorrágica, aunque los últimos estudios apuntan que los anticoagulantes de nueva generación no inducirían un incremento en el riesgo de HIC^{82,83}. En todos los casos se deben analizar los riesgos y beneficios del tratamiento de forma individualizada, ya que puede ser recomendable el uso de anticoagulantes en aquellos pacientes donde es importante prevenir un ictus isquémico a pesar del riesgo potencial de sufrir una HIC⁸³. Por otro lado, existe la posibilidad de realizar un tratamiento quirúrgico evacuando el hematoma. Sin embargo, aunque la cirugía podría disminuir los efectos de la compresión mecánica de la hemorragia, los riesgos podrían ser mayores debido a la agresividad del procedimiento, por lo que está recomendado a un número muy limitado de pacientes⁸⁴.

Desafortunadamente, no existen terapias modificadoras para la AAC y los ensayos clínicos que se han llevado a cabo hasta el momento son muy limitados. Uno de los ensayos ya concluidos consistía en un anticuerpo monoclonal humanizado anti-A β 40, Ponezumab (PF04360365, Pfizer). A pesar de los resultados prometedores obtenidos a nivel preclínico en ratones transgénicos⁸⁵, el ensayo clínico en fase II no mostró una mejoría en la reactividad vascular ni en el número de microhemorragias en pacientes diagnosticados con AAC probable⁸⁶. Sin embargo, es importante destacar que el tratamiento con Ponezumab fue seguro y bien tolerado, y aunque puede que el A β no se eliminara de los vasos, o no se eliminara lo suficiente para mejorar la reactividad vascular, tampoco se conoce la respuesta vascular a la inmunoterapia, pudiendo incluso provocar un aumento de la propia disfunción vascular⁸⁶. Por ello, aunque en términos globales no son buenas noticias en el campo de la AAC, es el primer ensayo de este tipo y arroja luz sobre la seguridad de la inmunoterapia en pacientes con AAC.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas destinadas a ralentizar o detener la progresión de la enfermedad y para ello es clave comprender los mecanismos fisiológicos y patológicos que engloba. Aunque se sigue sin comprender completamente estos mecanismos, el conocimiento y el interés en esta patología ha ido en aumento en los últimos años, proponiendo así diferentes enfoques terapéuticos plausibles para prevenir o tratar la AAC en un futuro cercano.

3. Biomarcadores en la AAC

Un biomarcador se define como aquella característica que puede ser medida de manera objetiva y puede ser utilizada como indicador de un proceso fisiológico, patogénico o de respuesta a una determinada intervención terapéutica. El concepto de biomarcador puede abarcar desde datos clínicos hasta características de neuroimagen, y cada vez se utiliza más para designar a aquellas moléculas como proteínas, lípidos o metabolitos que se encuentran asociadas a determinados procesos biológicos subyacentes a la enfermedad estudiada.

3.1 Marcadores de neuroimagen

La AAC comparte características frecuentes de enfermedad de pequeño vaso cerebral, entre las que se encuentran los microsangrados cerebrales (MSC) lobares, la siderosis superficial cortical (cSS, *del inglés, cortical superficial siderosis*), las hiperintensidades de la sustancia blanca y/o los espacios perivasculares dilatados (EPVD). Estos marcadores radiológicos son los más utilizados hasta el momento para el diagnóstico no invasivo de la AAC. En la Figura 7 se muestra una representación gráfica de los principales hallazgos neuroradiológicos detectados por RM en un paciente con AAC. Dentro de estos podemos distinguir dos tipos; los marcadores hemorrágicos y los no hemorrágicos.

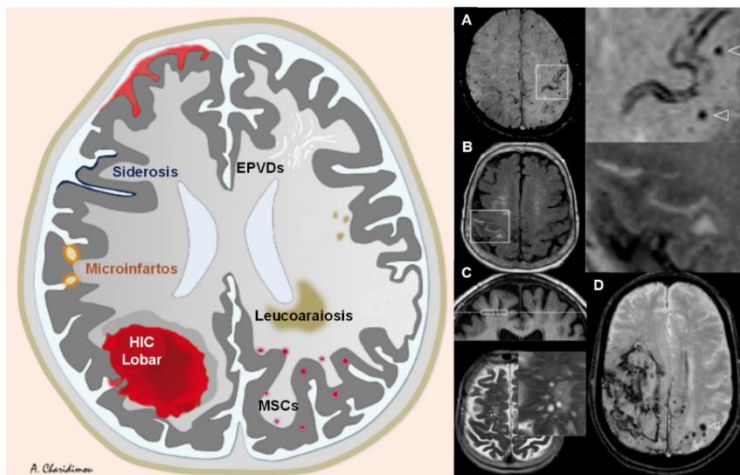


Figura 7. Representación esquemática de las principales características radiológicas de la AAC detectadas por resonancia magnética. Ejemplo de la detección por resonancia magnética de (A) siderosis y MSCs; (B) hiperintensidad lineal en el surco central derecho; (C) múltiples EPVDs; y (D) HIC en zona parietal. EPVDs: espacios perivasculares dilatados. MSCs: microsangrados cerebrales. HIC: hemorragia intracerebral. Modificado de Charidimou *et al.*, 2017 ⁴⁵.

Dentro de los marcadores hemorrágicos encontramos la HIC lobar, los MSC y la cSS. Como ya hemos comentado anteriormente, la HIC lobar sintomática es el evento clínico más relevante de la AAC, generando elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en los pacientes^{49,50}. Por otro lado, los MSC constituyen uno de los principales marcadores diagnósticos de los criterios de Boston y son muy comunes en la AAC^{45,87}. Aparecen como señales hipointensas en secuencia eco de gradiente T2* y corresponden con depósitos de hemosiderina que, debido a sus propiedades paramagnéticas, pueden ser detectados por RM en dicha secuencia⁸⁸. Los MSC relacionados con AAC tienen una localización estrictamente lobar y parecen estar relacionados con la progresión de la enfermedad y la recurrencia de la HIC^{87,89,90}. Sin embargo, su valor diagnóstico para la AAC en la población general es limitado ya que también se ha calculado que entre el 5 y el 24% de la población de edad avanzada presenta MSC^{91,92}.

Otro de los marcadores hemorrágicos que ha captado especial atención en los últimos años es la cSS, que se define como el depósito de hemosiderina en las capas superficiales de la corteza cerebral⁹³. Como hemos mencionado anteriormente, su inclusión en los criterios de Boston modificados ha mejorado la sensibilidad de los mismos en el diagnóstico de la AAC⁷⁹. De hecho, se ha encontrado en alrededor de un 40-60% de pacientes diagnosticados con AAC probable o definitiva, y, aunque los mecanismos fisiopatológicos subyacentes no se conocen completamente, se piensa que la siderosis se produce como consecuencia de microsangrados crónicos debido a la rotura de vasos corticales o leptomeníngeos en etapas de AAC avanzada^{79,94,95}. De hecho, se ha observado que la cSS se asocia a un mayor riesgo hemorrágico en pacientes con AAC⁹⁴⁻⁹⁷.

Dentro de los marcadores no hemorrágicos destacamos las lesiones de la sustancia blanca (LSB) o leucoaraiosis y los EPVD. La leucoaraiosis se define como la aparición de lesiones hiperintensas en RM en secuencia ponderada en T2 o FLAIR (recuperación de inversión atenuada de fluido). Patológicamente, se piensa que corresponden con áreas de desmielinización, pérdida axonal y/o activación microglial, probablemente debido a una disrupción de la BHE como consecuencia del depósito de A β ^{98,99}. Desde un punto de vista clínico se ha visto que estas lesiones están asociadas con el deterioro cognitivo¹⁰⁰. Además, pacientes con AAC presentan LSB más severas que controles sanos o pacientes con EA^{87,101,102}.

Otro de los marcadores no hemorrágicos detectados por RM son los EPVD. Como se ha mencionado anteriormente, los EPVD son cavidades de LCR que rodean las arterias del cerebro desde el espacio subaracnoideo hasta el parénquima, que al dilatarse, son detectados por RM en secuencia ponderada en T2. Aunque actualmente se desconoce su papel exacto y su implicación clínica, se ha visto que los pacientes con AAC-HIC presentan una mayor prevalencia de EPVD en el centro semioval (CSO) en comparación con HIC de otra etiología^{49,101,103}. Además, la severidad de los mismos se ha relacionado con el deterioro cognitivo¹⁰³. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que uno de los mecanismos que pueden explicar el depósito de A β cerebral sea una obstaculización en las vías de drenaje perivascular, provocando una dilatación en los espacios perivasculares que serían visibles por RM. En resumen, la presencia y severidad de los EPVD se presentan como marcadores prometedores para la AAC, aunque se requiere de más estudios para determinar sus bases patológicas.

También es importante mencionar que uno de los desafíos actuales es poder establecer la gravedad de la enfermedad a través de todos los parámetros de neuroimagen anteriores. Se ha propuesto una puntuación radiológica que tiene como objetivo estimar la carga patológica global de AAC en un paciente mediante la combinación de estos marcadores de imagen. Esta escala se ha definido como “carga total de enfermedad de pequeño vaso para AAC” (AAC-SVDB, *del inglés, small vessel disease burden*) y su puntuación oscila entre 0 y 6 puntos¹⁰⁴. Los valores se determinan evaluando la presencia y el grado de los principales marcadores radiológicos de la AAC (MSC lobares, cSS, LSB y EPVD)^{90,104}. El uso de la escala AAC-SVDB se validó en una cohorte de pacientes neuropatológicamente definida con AAC y se demostró que su puntuación se asociaba de manera independiente con los hallazgos patológicos y clínicos (HIC lobar sintomática) de estos pacientes¹⁰⁵. Por ello, la evaluación de esta escala podría ser importante para determinar el valor predictivo de futuros marcadores individuales o su posible utilización en ensayos clínicos.

3.2 Marcadores biológicos

Los depósitos de A β cerebral también se pueden detectar por técnicas de imagen molecular como la tomografía por emisión de positrones (PET) usando ligandos radioactivos¹⁰¹. Los radiotrazadores [¹¹C]-Pittsburgh Compound B (PiB) y [¹⁸F]-Florbetapir se unen directamente al A β fibrilar y son capaces de distinguir entre la HIC

relacionada con AAC de la HIC de origen hipertensivo^{106–108}. Sin embargo, esta técnica de imagen no es capaz de diferenciar entre los depósitos vasculares y los depósitos parenquimatosos de A β , impidiendo distinguir entre la AAC y la EA¹⁰⁹, por lo que la utilidad clínica del PET- A β para el diagnóstico de la AAC es muy limitada. No se han descrito otros ligandos que se unan preferentemente al A β vascular, excepto el derivado de fenoxazina resorufina, probado en ratones transgénicos Tg2576¹¹⁰. Sin embargo, este hallazgo no se ha estudiado en mayor profundidad en otros modelos animales ni en humanos.

Por otro lado, los marcadores bioquímicos que se pueden medir en fluidos periféricos como el plasma o el LCR, ofrecen otra opción para estudiar la fisiopatología de la AAC y permitir un diagnóstico más preciso de la enfermedad. Se han encontrado niveles más bajos de A β 42 en el LCR de pacientes con AAC y EA que en controles sanos. Además, los pacientes con AAC presentan niveles reducidos de A β 40 en comparación con pacientes con EA y con sujetos control. También se han descrito niveles reducidos de tau total y tau fosforilada en el LCR de pacientes con AAC en comparación con los pacientes con EA, pero presentan niveles más altos que los controles^{111–115}. Un estudio reciente apunta a la Apolipoproteína D como un biomarcador potencial de LCR en pacientes con AAC¹¹⁶, remarcando el interés en los últimos años por los marcadores en LCR también en el campo de la AAC. Desafortunadamente, estos hallazgos aún no se han trasladado a la práctica clínica habitual ya que se requiere su previa validación en cohortes con mayor número de pacientes.

En cuanto a los marcadores plasmáticos, los resultados encontrados en cohortes con un número limitado de pacientes en los niveles de A β 40 y A β 42 han sido heterogéneos y no se han replicado entre los grupos^{117,118}. En definitiva, pocos son los estudios que se han centrado en la búsqueda de nuevos marcadores biológicos para la AAC.

3.3 Marcadores genéticos

Los principales hallazgos genéticos en el campo de la AAC se han basado en los polimorfismos del gen que codifica para ApoE. ApoE es una apolipoproteína sintetizada mayoritariamente en el hígado y el cerebro y es secretada principalmente por los astrocitos y la microglia, aunque las neuronas también son capaces de secretarla¹¹⁹. Participa en la regulación del metabolismo de los lípidos a través del transporte, la distribución y la señalización neuronal y sináptica. Además se ha visto implicada en

procesos neuroinflamatorios y en la agregación del A β ⁵¹. Existen tres alelos principales del gen APOE: ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4, y codifican para proteínas que difieren únicamente en dos aminoácidos²⁵. El alelo ϵ 3 es el más común en la población general¹²⁰, mientras que el alelo ϵ 4 es el mayor factor de riesgo genético tanto para la EA como para la AAC y está asociado tanto al A β total como vascular^{121,122}. Por el contrario, el alelo ϵ 2 confiere un efecto protector únicamente frente al desarrollo de la EA, pero no para la AAC^{122–124}. De hecho, el alelo ϵ 2 confiere mayor riesgo de sangrado y hemorragia en pacientes con AAC^{125–127}. Se ha propuesto que los dos alelos implicados en la β -amiloidosis cerebral estarían implicados en diferentes mecanismos; el alelo ϵ 4 promovería el depósito de A β cerebral alterando la composición de las membranas basales, mientras que el alelo ϵ 2 favorecería que los vasos con alta carga de A β sufran cambios estructurales haciéndolos más propensos a su ruptura^{45,124,125}. Sin embargo, a pesar de que el rol de APOE en la β -amiloidosis cerebral ha sido extensamente estudiado, quedan muchas cuestiones sin resolver sobre el papel concreto que juega esta proteína. Cabe mencionar que se han descrito otras variantes genéticas relacionadas con la presencia de A β como el gen que codifica para la enzima convertidora de angiotensina (ACE, *del inglés, angiotensin-converting enzyme*) o para el receptor del complemento 1 (CR1, *del inglés, complement receptor 1*)^{128,129}. Sin embargo, se desconoce su implicación en la patología y no han sido validadas en otras cohortes.

En resumen, sigue siendo una prioridad encontrar nuevos marcadores para predecir el pronóstico de aquellos pacientes que han sufrido una HIC asociada a AAC, especialmente en términos de recurrencia hemorrágica y deterioro cognitivo. Además, el poder realizar un diagnóstico más preciso y diferencial de la patología permitiría identificar nuevos candidatos que nos ayudarían a monitorizar de forma más rigurosa los futuros tratamientos para esta enfermedad.

4. Enfermedad de Alzheimer (EA)

4.1 Aspectos clínicos

La EA es la causa más común de demencia en la población anciana¹³⁰. Se define como un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible que se manifiesta principalmente con una pérdida de la función cognitiva y con alteraciones de la conducta, incluyendo la memoria, la comprensión, el lenguaje o el razonamiento⁴⁵.

Desde un punto de vista clínico, la EA se puede clasificar en 3 etapas; una etapa preclínica asintomática, una etapa de deterioro cognitivo leve y una fase final de demencia. La fase preclínica de la enfermedad precede al inicio de los síntomas clínicos en al menos 10 o 20 años¹³¹. El síntoma inicial más común es la pérdida de memoria a corto plazo. Posteriormente y de manera progresiva, empeora el trastorno del lenguaje y existe una afectación en las funciones ejecutivas. Los síntomas neuropsiquiátricos como la apatía, el aislamiento social o la psicosis son comunes en la etapa media y tardía. En estadios avanzados de la enfermedad el paciente es completamente dependiente, aparecen alteraciones en la memoria remota, y sufren alteraciones en las funciones ejecutivas a medida que progresa la enfermedad^{132,133}.

La mayoría de los casos de EA ocurren después de los 65 años (EA de inicio tardío o esporádico), mientras que la EA familiar o de aparición temprana (entre 30-50 años de edad) representa menos del 5% de todos los casos y se debe directamente a mutaciones en los genes PPA, PS1 y PS2, implicados en la producción de A β ¹³⁴. Cabe decir, que además de esos tres genes, se han encontrado otras variantes genéticas en otros genes que también aumentan el riesgo de padecer EA familiar, como el gen TREM2, expresado por la microglía e involucrado en la respuesta inflamatoria¹³⁵. Por otro lado, en la EA esporádica se han identificado más de 20 variaciones genéticas implicadas en procesos inflamatorios o en el metabolismo del colesterol entre otros, que contribuyen a aumentar o disminuir el riesgo de padecer la enfermedad¹³⁶. Sin embargo, el principal factor de riesgo asociado a la EA esporádica es la edad, seguido del genotipo de APOE. Como hemos mencionado anteriormente, la presencia del alelo ϵ 4 aumenta el riesgo de padecer EA^{121,122}.

4.2 Características patológicas

El cerebro de los pacientes de Alzheimer se caracteriza por presentar rasgos anatómicos y patológicos muy característicos. El principal cambio detectado a nivel macroscópico es la atrofia cerebral cortical acompañada del ensanchamiento de los surcos, la dilatación y agrandamiento de los ventrículos y la disminución del volumen cerebral que se puede detectar por RM. Es muy frecuente que estos cambios vengán acompañados de una patología cerebrovascular subyacente, por lo que también es común encontrar microinfartos corticales, infartos lacunares en los ganglios basales y desmielinización de la sustancia blanca periventricular¹³⁷. Por otro lado, las principales características histopatológicas de la EA son el depósito extracelular de A β en forma de placas

neuríticas y la acumulación intracelular de proteína tau hiperfosforilada formando ovillos neurofibrilares. Estas lesiones están acompañadas de una pérdida neuronal progresiva y sináptica y de un proceso inflamatorio caracterizado por la activación de la microglia y de los astrocitos^{131,138,139}.

4.2.1 Placas neuríticas

Las placas neuríticas son agregados extracelulares de A β insoluble (mayoritariamente por A β 42) que se acumulan en el parénquima cerebral. Tienen aspecto filamentososo y están rodeadas de astrocitos y suelen aparecer asociadas a microglía activa. También es frecuente encontrar placas difusas, de estructura amorfa y sin un núcleo central compacto (Figura 8). Sin embargo, estas últimas no se consideran en los criterios neuropatológicos de la EA ya que son un rasgo común en personas de edad avanzada¹³³.

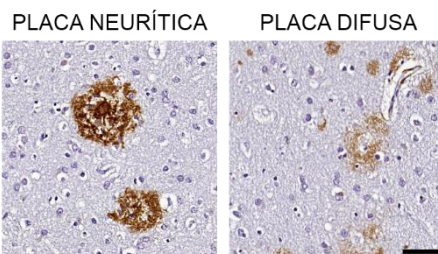


Figura 8. Placas neuríticas y placas difusas encontradas en el córtex de un caso con EA. Inmunohistoquímica para A β (4G8). Barra de escala 50 μ m.

La distribución cerebral de los depósitos extracelulares de A β es variable entre individuos, pero normalmente se encuentran distribuidos a lo largo de todas las capas del córtex. De hecho, su localización es dependiente de la fase en la que se encuentra la enfermedad¹⁴⁰. A grandes rasgos, las placas neuríticas comenzarían a depositarse en el neocórtex, extendiéndose hacia el hipocampo y la corteza entorrinal. A continuación se vería afectado el estriado y finalmente, en etapas muy avanzadas de la enfermedad pueden aparecer depósitos de A β en el tronco cerebral, tálamo e incluso en el cerebelo¹⁴⁰.

Es importante mencionar que aunque inicialmente la neurotoxicidad en la EA se asoció a la presencia de placas neuríticas, se ha demostrado que las formas solubles de A β correlacionan mejor con el deterioro cognitivo y son más tóxicas^{131,141}. Además, se ha observado acumulación intracelular de A β tanto en los cerebros de pacientes con EA como en modelos de ratones transgénicos y se piensa que ocurre de manera temprana y que precedería al depósito extracelular^{4,142,143}.

4.2.2 Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares son agregados de proteína tau hiperfosforilada que se encuentran en el interior de las neuronas formando filamentos helicoidales. En condiciones fisiológicas, tau es una proteína altamente soluble que se encuentra asociada a los microtúbulos del citoesqueleto favoreciendo su estabilización y ensamblaje. Sin embargo, en la EA, esta proteína aparece hiperfosforilada, dificultando su unión a los microtúbulos y disminuyendo la estabilidad de los mismos. Esto tiene una afectación directa en el transporte axonal, contribuyendo al daño celular y desencadenando finalmente una disfunción y muerte neuronal^{131,133,144}.

A diferencia del depósito extracelular de A β , la localización de los ovillos neurofibrilares en los pacientes con EA sigue un patrón determinado y predecible. Su distribución fue descrita en los estadios de Braak. En términos generales, las lesiones neurofibrilares comienzan en la corteza entorrinal (Braak I-II) y avanzan hacia el hipocampo (Braak III-IV), afectando finalmente a las áreas sensoriales primarias en las etapas más avanzadas de la enfermedad (Braak V-VII)¹⁴⁵.

4.3 Incidencia y prevalencia

Actualmente se estima que hay 50 millones de personas con demencia en todo el mundo, y dos de cada tres de estos casos se deben a la EA¹³⁰. Se prevé que esta cifra aumente hasta los 82 millones en 2030 y hasta los 152 millones para el año 2050. La prevalencia y la incidencia de EA es mayor en las mujeres que en los hombres y esta discrepancia aumenta con la edad¹⁴⁶.

La EA tiene efectos devastadores para la salud de los pacientes y para sus cuidadores. Supone un importante impacto socioeconómico tanto en las familias afectadas como en los sistemas de salud. Además, teniendo en cuenta la mejora de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población, se prevé que esa cifra siga aumentando con los años. Por eso es importante realizar avances significativos tanto en la prevención como en el tratamiento de esta enfermedad ya que la EA supone uno de los desafíos más grandes a nivel mundial^{130,147}.

4.4 Diagnóstico y biomarcadores

El diagnóstico definitivo de la EA requiere de un examen histopatológico en tejido *post mortem* para confirmar la presencia de placas neuríticas y de ovillos neurofibrilares. Sin embargo, en la práctica clínica se utilizan diferentes criterios para su diagnóstico¹³³.

Los criterios clásicos de diagnóstico de la EA se basaban exclusivamente en la valoración cognitiva del paciente, evaluando la memoria, el aprendizaje y las funciones ejecutivas y visuales, entre otras¹⁴⁸. Sin embargo, gracias al avance en el conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad, los criterios se han modificado y ahora tienen como objetivo identificar la enfermedad en sus etapas iniciales. El diagnóstico de la EA en estado preclínico es posible gracias a los biomarcadores, detectados a lo largo de las diferentes etapas de la enfermedad (Figura 9). En los primeros estadios de la EA se pueden encontrar biomarcadores de amiloidosis cerebral, como la disminución de A β 42 en el LCR o la detección por PET de un aumento en la carga cerebral de A β ^{108,149,150}. Progresivamente aparecen biomarcadores de disfunción sináptica y daño funcional, como la disminución en la captación de fluorodesoxiglucosa por PET^{151,152}. Finalmente aparecen marcadores de pérdida neuronal y daño estructural, como la atrofia cerebral detectada por RM^{152,153}. Es importante mencionar que aunque el incremento de tau en el LCR no es específico de la EA, sí se correlaciona con la gravedad clínica de la enfermedad, ya que sus niveles aumentan al mismo tiempo que aumenta el deterioro cognitivo¹⁵⁴. Además, actualmente se están probando ligandos específicos de tau por PET, lo que permitiría su uso como biomarcador en un futuro^{155,156}.

En 2018, con los nuevos avances científicos, estos últimos criterios se han modificado nuevamente incorporando la evidencia de los biomarcadores fisiopatológicos, que apoyarían el diagnóstico de la EA, pero sin ser imprescindibles^{157,158}. Esta visión cambia el concepto de la EA, pasando de una visión exclusivamente clínica, a englobar una visión desde el punto de vista biológico, que comienza décadas antes (10-20 años) de presentarse los síntomas clínicos. Por tanto, esto supone el inicio de una nueva era en la que los biomarcadores biológicos cobran importancia y ofrecen nuevas posibilidades en la búsqueda de un diagnóstico más precoz y preciso que además pueda abrir paso a nuevos tratamientos que modifiquen el curso de la enfermedad.

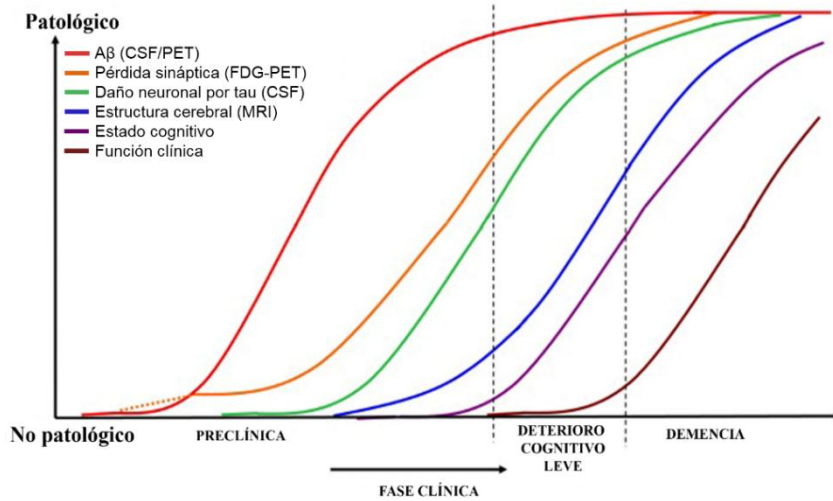


Figura 9. Sucesión de parámetros clínicos y biológicos en la EA. Modificado de Sperling *et al.*, 2011¹⁵⁹.

4.5 Tratamiento

El tratamiento actual para los pacientes diagnosticados con EA se basa en fármacos que modulan la acción de dos neurotransmisores, la acetilcolina y el glutamato, implicados en procesos de memoria y aprendizaje. Actualmente hay cinco fármacos aprobados, tres inhibidores de la acetilcolinesterasa (Donezepilo, Rivastigmina y Galantamina), un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (Memantina), y recientemente se ha aprobado un anticuerpo monoclonal dirigido a A β (Aducanumab). Sin embargo, todos estos fármacos tienen una eficacia limitada y no revierten el curso de la enfermedad^{160,161}.

Actualmente el esfuerzo de la comunidad científica está enfocado en la búsqueda de dianas terapéuticas que consigan modificar o revertir la enfermedad. La mayor parte de las estrategias se han centrado en prevenir la generación del péptido A β , su agregación, toxicidad o aumentar su degradación y aclaramiento. Se han llevado a cabo diferentes enfoques: inmunización activa¹⁶², inhibidores de la γ - y β -secretasas¹⁶³, inhibidores de la hiperactividad neuronal, tratamiento con inmunoglobulinas¹⁶⁴ o fármacos dirigidos al daño neuronal causado por tau¹⁶⁵, entre otros. Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha demostrado hasta la fecha eficacia consistente en términos cognitivos, aunque la mayoría de ellas sigue bajo investigación en diversos ensayos clínicos^{160,161}.

Además de los ensayos farmacológicos, actualmente también se están evaluando en diferentes ensayos clínicos múltiples técnicas de neuroestimulación en aquellas áreas del cerebro más vulnerables al desarrollo de la patología¹⁶⁶.

Dentro de todas las estrategias que se están abarcando para abordar la EA, cabe destacar la inmunización pasiva como una de las estrategias que más interés ha despertado en la última década. La inmunización pasiva consiste en la administración de anticuerpos que reconocen específicamente un epítipo activando la respuesta inmune. Se han probado varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra A β en diferentes modelos animales y se han obtenido resultados muy prometedores en términos de disminución de la carga amiloide cerebral, de neuroinflamación e incluso de mejora en los déficits de memoria¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. En base a estos resultados preclínicos, se ha evaluado la eficacia de varios anticuerpos en ensayos clínicos en pacientes con EA. Sin embargo, aunque la mayoría de ellos ha demostrado una disminución en la carga amiloide cerebral, no se han visto mejoras significativas en el deterioro cognitivo de los pacientes, a excepción del Aducanumab, recientemente aprobado por la agencia reguladora de los medicamentos en Estados Unidos^{160,161}. En este ensayo se observó una reducción significativa de los niveles cerebrales de A β así como una ralentización en el deterioro cognitivo de los pacientes¹⁷¹. Aunque los beneficios clínicos de este anticuerpo no están del todo claros, se ha aprobado para su comercialización con la condición de que se realice un nuevo ensayo (fase IV) para verificar esos beneficios. En cualquier caso, la aprobación de Aducanumab puede suponer un punto de inflexión en el tratamiento y avance de esta patología.

Por otro lado, es importante mencionar que en algunos de los ensayos de inmunización pasiva se observaron anomalías de imagen asociadas a amiloide (ARIA, *del inglés, amyloid-related imaging abnormalities*). Algunos de los pacientes presentaron ARIA-E, asociado a edema vasogénico, mientras que otros presentaron ARIA-H, asociado a microhemorragias y cSS. De hecho, en los ensayos con Bapineuzumab, Gantenerumab y Aducanumab se observó que la incidencia de ARIA-E era dosis dependiente y se encontraba con mayor frecuencia en aquellos pacientes que presentaban el alelo ϵ 4 de APOE¹⁷²⁻¹⁷⁴.

5. Principales diferencias e interacciones entre la AAC y EA

A pesar que la acumulación anómala de A β en el cerebro es la causa principal de la AAC y la EA, existen similitudes y diferencias entre ambas que hay que tener en cuenta. En primer lugar, debido a la diferente localización de los depósitos de A β , los mecanismos por los que ambas patologías dan lugar a una lesión cerebral son diferentes. Los mecanismos exactos de la lesión cerebral asociada a la EA no están del todo claros, pero parecen centrarse en la pérdida sináptica y neuronal¹⁷⁵. Por el contrario, las lesiones cerebrales asociadas a la AAC surgirían de la disfunción de los vasos sanguíneos¹⁷⁶. A pesar de estas diferencias entre la lesión neurodegenerativa en la EA y la lesión cerebrovascular en la AAC, parece existir una relación en los mecanismos patogénicos¹⁷⁷. Por ejemplo, la disfunción vascular se ha identificado como un estadio temprano en la patogénesis de la EA¹⁷⁸. Además, a pesar de que el depósito de tau no es una característica destacada de la AAC, se han observado depósitos de esta proteína alrededor de los vasos positivos de A β en la AAC tanto en su forma esporádica como en su forma hereditaria⁵⁸. Además, los estudios de neuroimagen respaldan aún más esta relación entre ambas lesiones. Se ha observado que los pacientes con EA tienen una mayor prevalencia de MSC que los individuos sanos^{179,180}. Del mismo modo, aunque la atrofia cerebral es el marcador de neuroimagen por excelencia de la EA, también se ha reportado en otras enfermedades cerebrovasculares entre las que se encuentra la AAC^{177,181}.

Como hemos ido exponiendo al largo de esta introducción, la principal interacción que existe entre ambas patologías es la acumulación de A β , posiblemente en su circulación dentro del LI y a las vías de eliminación de A β . Como hemos explicado anteriormente, la hipótesis más aceptada sobre la acumulación de A β cerebral es la alteración en los mecanismos de eliminación del mismo, siendo el drenaje perivascular la vía que mayor implicación parece tener tanto en la AAC como en la EA^{10,11}.

Es importante destacar que las interacciones entre la fisiopatología de ambas enfermedades tienen varias implicaciones en su tratamiento. De hecho, los anticuerpos anti-A β se han probado extensamente en la EA, pero no han tenido el éxito esperado, reportando ARIA en muchos ensayos¹⁷²⁻¹⁷⁴. Los mecanismos que subyacen a ARIA no

se comprenden completamente, pero la evidencia disponible sugiere que la ruptura de las placas neuríticas mediada por los anticuerpos liberaría A β , el cual se depositaría posteriormente en los vasos cerebrales, dando lugar a un aumento de AAC y a una alteración en el mecanismo de aclaramiento perivascular¹⁷⁷. Aunque existe un debate sobre la implicación clínica de los ARIA, es evidente que son efectos adversos graves que han retrasado el uso de la inmunoterapia en la EA, y especialmente en la AAC. Además, destaca la importancia de desarrollar nuevos métodos de imagen que sean capaces de distinguir entre el A β vascular y las placas neuríticas en los pacientes para enfocar diferentes tratamientos.

Por otro lado, a pesar que el A β es el componente principal de las placas neuríticas y de la AAC, la longitud de los péptidos parece determinar su localización preferente. Así, el A β 40 es el componente principal de los vasos cerebrales afectados por AAC, mientras que el A β 42 es el componente mayoritario de las placas neuríticas encontradas en la EA^{182,183}. El A β 42 es más insoluble y tiende a depositarse en el parénquima cerebral formando las placas neuríticas, mientras que el A β 40 es más soluble y puede difundir a lo largo de las vías de drenaje perivascular para finalmente depositarse en los vasos cerebrales¹⁷⁷. Las principales características de la deposición del A β vascular o parenquimatosos están representadas en la Tabla 2. Actualmente se sigue sin comprender cuáles son los mecanismos que favorecen la deposición de A β en un lugar u otro. Se conocen otros factores bioquímicos que determinan la conformación del A β y el sitio de deposición dentro del cerebro, como las sustituciones de aminoácidos específicas en la secuencia del péptido. En este sentido, las mutaciones en el gen APP que flanquean la región codificante de A β generalmente aumentan los niveles de A β 42 y están relacionadas con la formación de placas neuríticas. Por el contrario, las mutaciones en el gen APP localizadas dentro o fuera de la secuencia de A β inducen un fenotipo clínico de AAC prominente^{45,177,184}.

TABLA 2. COMPARACIÓN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL DEPÓSITO DE A β VASCULAR Y EN PLACAS NEURÍTICAS. Modificado de Viswanathan, *et al.*, 2011¹⁸⁵ y de Greenberg *et al.*, 2020¹⁷⁷.

	DEPÓSITO A β VASCULAR	DEPÓSITO A β PLACAS NEURÍTICAS
Aβ predominante	A β 40	A β 42
Localización Aβ	Lóbulo occipital	Lóbulos frontal, parietal y temporal
Alelo APOE	APOE ϵ 4 (depósito amiloide) APOE ϵ 2 (ruptura vaso y hemorragia)	APOE ϵ 4 (depósito amiloide)
Mutaciones APP	Mutaciones dentro de la secuencia del péptido A β	Mutaciones en regiones flanqueantes a la región codificante para A β

Los estudios neuropatológicos han demostrado que el depósito de A β en placas neuríticas o en vasos cerebrales puede ocurrir de manera independiente o puede coexistir en un mismo individuo (Figura 10). Se han identificado varias proteínas que se depositan conjuntamente con el A β en placas neuríticas y en AAC, como las proteínas del complemento¹⁸⁶, el componente amiloide-P sérico¹⁸⁷, los glicosaminoglicanos¹⁸⁸ y ApoE o ApoJ¹⁸⁹ (Tabla 3). Varios estudios en modelos animales de EA y AAC han demostrado que estas proteínas colocalizan con depósitos cerebrales de A β y están involucradas en procesos inflamatorios cerebrales mediados por microglia, en la agregación y formación de fibras amiloides, o en la eliminación de A β del cerebro por fagocitosis o a través del transporte activo a través de BBB^{177,190,191}. El estudio de estas proteínas asociadas a amiloide parece un enfoque válido para encontrar nuevos factores capaces de inhibir o promover la interacción con el A β .

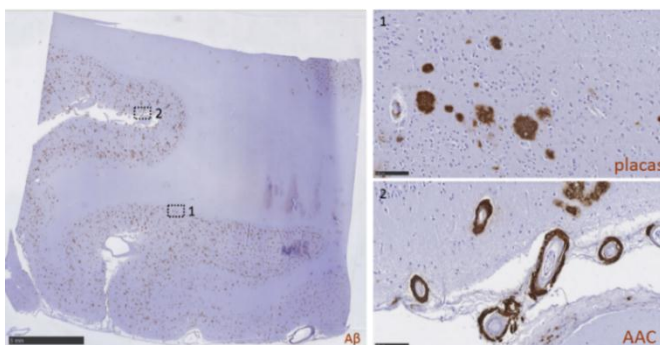


Figura 10. Ejemplo histopatológico de A β coexistente en placas neuríticas y en vasos cerebrales leptomeníngeos y corticales. Modificado de Charidimou *et al.*, 2020¹⁷⁷.

Son muchos los estudios proteómicos llevados a cabo en el campo de la EA en los que se ha confirmado la participación de proteínas previamente asociadas con A β y en los que también se han identificado nuevos componentes, la mayoría de los cuales no han sido investigados en AAC^{177,191,192}. De hecho, los estudios proteómicos realizados en el campo de la AAC son muy limitados. El análisis proteómico del amiloide vascular ha confirmado la presencia de ApoE o ApoJ en vasos leptomeníngeos y corticales de cerebros de pacientes con AAC¹⁹³⁻¹⁹⁵. A partir de estos estudios, se han identificado otras proteínas interesantes asociadas con los depósitos vasculares pero no con placas neuríticas, como TIMP3 (inhibidor de metaloproteínasa 3)^{194,196}, Norrin, COL6A2 (cadena α -2 (VI) de colágeno)¹⁹⁵ y SRPX1 (*del inglés, Sushi repeat-containing protein-1*)¹⁹⁷ (Tabla 3). Algunas de estas proteínas contribuyen a la degeneración vascular, como la capacidad de SRPX1 para aumentar la actividad de la caspasa tras el tratamiento con A β 40 *in vitro*¹⁹⁷. Por otro lado, la deposición de fibrinógeno, un precursor de la fibrina y principal contribuyente a la hemostasia, también se ha detectado en vasos positivos de A β en pacientes con EA y se ha descrito que la ausencia de esta proteína en modelos de ratones transgénicos disminuye la patología de ACC y el deterioro cognitivo, sugiriendo que este candidato podría jugar un papel crítico en la patología¹⁹⁸. Es importante destacar que aunque se han encontrado algunas proteínas asociadas específicamente al A β vascular, se necesitan más estudios funcionales que permitan elucidar su implicación en la patología, así como el descubrimiento de otros factores que permitan comprender la complejidad de la formación y agregación de estos depósitos en una localización específicamente vascular.

En base a todo lo anterior, podemos afirmar que existen diversas interacciones entre la fisiopatología de la EA y la AAC. La comprensión de la relación entre ambas patologías es esencial para identificar los factores que favorecen la deposición de A β en un compartimento o en otro y poder así explorar herramientas de diagnóstico diferenciales y abordar nuevos tratamientos que ralenticen la progresión de ambas enfermedades.

TABLA 3. PROTEÍNAS CO-DEPOSITADAS CON EL A β EN VASOS CEREBRALES Y EN PLACAS NEURÍTICAS. Modificado de Greenberg *et al.*, 2020¹⁷⁷

ASOCIADAS CON EL DEPÓSITO A β VASCULAR Y PARENQUIMATOSO	PRINCIPALMENTE ASOCIADAS CON EL DEPÓSITO A β PARENQUIMATOSO	PRINCIPALMENTE ASOCIADAS CON EL DEPÓSITO A β VASCULAR
ApoE	α 1-anticimotripsina	Fibrinógeno
ApoJ	α 2-macroglobulina	TIMP3
ApoA1	Glicosaminoglicanos	Norrin
Vitronectin	Syndecan-1	COL6A2
Proteína de choque térmico HspB2	Syndecan-3	SRPX1
Glicosaminoglicanos	Proteína de choque térmico Hsp20	
Syndecan-2	Proteína de choque térmico HspB8	
Glypican-1	Molécula de adhesión intracelular-1	
Agrin	Precursor del componente colágeno de la placa amiloide de Alzheimer	
Colágeno XVIII		
Componente amiloide P-sérico		
Proteínas complemento: C1q, C3c, C4d, C5-9		

Limitado a proteínas que se depositan conjuntamente con A β y se han investigado en depósitos A β vasculares y parenquimatosos del cerebro humano. SRPX1: del inglés, sushi repeat-containing protein-1; COL6A2: cadena α -2 (VI) de colágeno; TIMP3: inhibidor de metaloproteínasa 3.

6. Modelos animales de β -amiloidosis cerebral

El desarrollo de modelos animales ha sido una prioridad en el campo de la β -amiloidosis cerebral tanto para entender los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, como para estudiar los efectos de posibles candidatos terapéuticos a nivel preclínico.

Sin embargo, los roedores no desarrollan ni EA ni AAC de manera espontánea, ni siquiera en edades muy avanzadas. Por ello se utilizan modelos murinos, que de manera similar a la β -amiloidosis humana, presenten placas neuríticas y/o AAC^{199–203}. Actualmente existen más de 150 modelos murinos disponibles para el estudio de la EA

(alzforum.org) y todos ellos deben de reproducir al menos uno de los procesos patológicos observados en la patología. Es importante mencionar que aunque los modelos más estudiados han sido los ratones transgénicos, también se han desarrollado ratas transgénicas y ratones knock-in y knock-out para el estudio de la EA²⁰⁴.

6.1 Modelos transgénicos para el estudio de la AAC

Los modelos animales más utilizados son aquellos que sobreexpresan los genes humanos portando las mutaciones genéticas asociadas con la EA y/o AAC en sus formas familiares. De hecho, la mayoría de las líneas transgénicas disponibles son aquellas que sobreexpresan los genes PPA y PS1 conteniendo diferentes mutaciones que favorecen la acumulación de A β ^{199-203,205}.

Aunque se han desarrollado una gran variedad de modelos murinos para el estudio de la EA, no se ha prestado tanta atención a la AAC y en muchos de los modelos de EA no se ha estudiado el posible depósito vascular de A β ^{199-203,205}.

De los modelos de β -amiloidosis cerebral, en la Tabla 4 se muestran los principales modelos transgénicos en los que se ha estudiado más extensamente tanto el depósito de A β parenquimatoso como el depósito de A β vascular.

De todos los modelos anteriores hay que hacer una mención especial a los modelos asociados a la AAC familiar, ya que aunque son limitados, son imprescindibles para comprender mejor la fisiopatología de la AAC, estudiar su relación con la EA y para establecer nuevas herramientas de diagnóstico y probar nuevos tratamientos potenciales en términos de eficacia y seguridad. Hasta el momento, el único modelo que desarrolla AAC en ausencia de placas amiloides en el parénquima es el modelo APPDutch²⁰⁶. Estos ratones sobreexpresan la isoforma 751 de la PPA humana y portan la mutación holandesa E693Q. Cabe destacar que esto es un buen ejemplo de cómo una única sustitución de aminoácidos es suficiente para dirigir el A β hacia la vasculatura cerebral. Por otro lado, la aparición de los primeros depósitos vasculares en los vasos leptomeníngeos y corticales no es hasta los 22-25 meses de edad, lo que supone el principal inconveniente de este modelo para su uso en investigación²⁰⁶.

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LOS MODELOS TRANSGÉNICOS DE AAC. Modificado de Jäkel *et al.*, 2017 ¹⁹⁹.

MODELO	MUTACIÓN	EDAD INICIO AAC	A β PREDOMINANTE	PRESENCIA PLACAS	REGIONES CEREBRALES AFECTADAS	REF.
APPDutch	E693Q	22-25 meses	A β 40	NO	Córtex	206
Tg-SwDI	K670N/M671L, E693Q, D694N	3 meses	A β 40 > A β 42	SI	Tálamo, subículo	207
APP/Ld	V717I	15-24 meses	A β 40 > A β 42	SI	Córtex	208
ArcAβ	E696G, K670N/M671L	9-15 meses	A β 40 > A β 42	SI	Córtex	209
Tg2576	K670N/M671L	7-10 meses	A β 40 > A β 42	SI	Anterior > posterior	210
APP23	K670N/M671L	9-12 meses	A β 40 > A β 42	SI	Córtex, hipocampo, tálamo	211

Las mutaciones que aparecen son: holandesa (E693Q), doble mutación sueca (K670N/M671L), ártica (E693G), London (V717I) e Iowa (D694N). Abreviaciones: Ref.: referencia.

Por otra parte, otro de los modelos que se desarrolló para estudiar principalmente la AAC fue el modelo Tg-SwDI. Estos ratones sobreexpresan la isoforma 770 de la PPA humana y contienen las mutaciones sueca, holandesa y de Iowa. Desarrollan AAC de manera temprana, ya que los primeros depósitos vasculares de A β se observan a los 3 meses de edad²⁰⁷. Sin embargo, aunque algunas arterias y arteriolas si se ven afectadas, la patología es más prominente en los capilares, siendo un modelo muy útil para el estudio de la AAC de tipo 1. Además, aunque se observan depósitos parenquimatosos de A β , la mayoría son difusos y no fibrilares. Cabe destacar que aunque sí que se han detectado algunas microhemorragias, no son una característica destacada de este modelo²⁰⁷. De hecho, de todos los modelos presentados anteriormente, sólo los modelos APPDutch, ArcA β , Tg2576 y APP23 presentan microhemorragias cerebrales asociadas a AAC¹⁹⁹. Aun así, la principal limitación de los dos primeros modelos es la edad tardía en la que aparecen; a partir de los 22 meses en el APPDutch, y a partir de los 18 meses en el ArcA β ^{207,212}. Por otro lado, aunque el modelo Tg2576 es uno de los modelos más

estudiados para la EA y también presenta microhemorragias, la patología de AAC es menos abundante en estos ratones en comparación con el modelo APP23, por lo que sería más adecuado como modelo de investigación para la EA asociada a AAC que para el estudio propiamente de AAC²¹⁰.

En este contexto, en la presente tesis doctoral se han caracterizado dos modelos de β -amiloidosis cerebral utilizados rutinariamente en nuestro laboratorio, en términos neuropatológicos de AAC. Se trata del modelo APP23, extensamente estudiado tanto en la AAC como en la EA por la acumulación de $A\beta$ a nivel vascular y en forma de placas parenquimatosas, y el modelo 5xFAD, ampliamente estudiado en la EA por la temprana acumulación de $A\beta$ en parénquima²¹³.

6.2 Modelo APP23

El modelo APP23 fue el primer modelo en el que se describió un desarrollo de AAC significativo²¹¹. Estos ratones sobreexpresan la isoforma PPA751 humana con la doble mutación sueca (K670N/M671L) bajo el control de un promotor murino neuronal (Thy-1)^{211,214}. Estos ratones presentan acumulación de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42, aunque tal y como ocurre en humanos, la liberación de $A\beta$ 40 es mucho más abundante²¹⁵.

Las placas amiloides comienzan a depositarse a partir de los 6-9 meses de edad y es a partir de los 12 meses cuando desarrollan AAC en los vasos leptomeníngeos, corticales y en los vasos del hipocampo²¹⁴⁻²¹⁶. El aumento del depósito vascular y parenquimatoso de $A\beta$ es progresivo y aumenta con la edad. Se ha descrito también que el desarrollo de la patología de $A\beta$ es más rápido en las hembras²¹⁷. Además, a diferencia de la AAC humana, estos ratones presentan vasos afectados por $A\beta$ en el tálamo^{214,215}. El $A\beta$ cortical se puede detectar por PET con el ligando PiB a partir de los 12 meses de edad²¹⁸.

Por otra parte, el modelo APP23 presenta niveles altos de neuroinflamación, con activación de astrocitos y microglia alrededor de las placas neuríticas^{217,219}. Aunque no se han observado ovillos neurofibrilares en este modelo, sí se ha descrito que tienen tau hiperfosforilada. Además se han observado cambios en los niveles de $A\beta$ y tau en el LCR de estos ratones; es a partir de los 16 meses de edad cuando empiezan a disminuir los niveles de $A\beta$ 42 hasta llegar a una reducción del 60% a los 30 meses. También se ha descrito un aumento de tau total en el LCR en animales APP23 de 24 a 26 meses de edad²²⁰.

Este modelo parece una buena herramienta para estudiar las posibles diferencias en el depósito amiloide entre la EA y la AAC y los mecanismos patológicos subyacentes ya que presenta características clínicas de ambas patologías; se ha descrito muerte neuronal en la región CA1 del hipocampo^{221,222}, y también microhemorragias cerebrales a partir de los 16 meses de edad²²³⁻²²⁵. De hecho, la mayor parte de las hemorragias afectan a la corteza cerebral y en menor medida, al tálamo, contrastando con la AAC humana, en la que las HIC son exclusivamente lobares²²³⁻²²⁵.

En cuanto a los estudios de comportamiento de estos animales, se ha descrito que los primeros déficits en la memoria espacial aparecen a partir de los 3 meses de edad y aumentan de manera progresiva con la edad. Sin embargo, los déficits en los otros tipos de memoria no aparecen hasta los 18-24 meses²²⁶.

6.3 Modelo 5xFAD

El modelo 5xFAD es un modelo doble transgénico que sobreexpresa los genes humanos PPA y PS1 con cinco mutaciones asociadas al EA familiar; tres de ellas en el gen humano PPA695 y dos de ellas en PS1. Las mutaciones que presentan asociadas a PPA son la sueca (K670N/M671L), Florida (I716V) y London (V717I). Por otro lado, las mutaciones en PS1 son M145L y L286V. Ambos genes se encuentran bajo el control del promotor murino Thy-1²¹³. La mutación sueca provoca un aumento en los niveles totales de A β , mientras que las otras mutaciones descritas aumentan de manera específica la producción de A β 42. Esto es lo que genera que este modelo en concreto presente mayores niveles de A β 42 que de A β 40²¹³.

La acumulación de A β aparece de forma muy temprana, y es que a las 6 semanas ya se pueden encontrar acumulaciones intraneuronales de A β 42 y a partir de los 2 meses aparecen los primeros depósitos extracelulares de A β en las capas corticales profundas y en el hipocampo (subículo), extendiéndose finalmente al tálamo, bulbo raquídeo y olfatorio^{213,227,228}.

Por otra parte, estos animales experimentan una disfunción sináptica progresiva y dependiente de la edad, observando una disminución de niveles sinápticos a partir de los 9-12 meses de edad²¹³. También se ha descrito una pérdida neuronal de aproximadamente el 40% en animales de 12 meses de edad, por lo que desde el punto de vista clínico, es un buen modelo para estudiar la EA²²⁸. Sin embargo, no presenta

ovillos neurofibrilares, aunque si se ha descrito la presencia de tau hiperfosforilada a los 7 meses de edad²²⁹.

Cabe destacar que pocos estudios han detectado depósito vascular de A β en el modelo 5xFAD, incluyendo el estudio de Giannoni *et al.*, donde mostraban imágenes multifotónicas a los 3 meses de edad en un número muy reducido de animales²³⁰. Sin embargo, sí que se ha descrito patología vascular asociada a AAC en animales 5xFAD que portan los alelos humanos de APOE (modelo transgénico EFAD). En este modelo se observan microhemorragias cerebrales a partir de los 2 meses de edad y vasos corticales positivos para A β a partir de los 6 meses de edad, con mayor patología en las hembras que en los machos^{231,232}. Hasta la fecha, no existen más estudios sobre la implicación de la AAC en el modelo 5xFAD y se desconoce si este modelo animal manifiesta microhemorragias cerebrales asociadas a AAC en ausencia del alelo APOE humano.

Por último, los estudios de comportamiento han demostrado que estos ratones presentan importantes déficits en las pruebas de memoria espacial a partir de los 3-6 meses empeorando con la edad. También se ha observado que los ratones 5xFAD a partir de los 9-12 meses de edad presentan una disminución progresiva de la ansiedad y déficits motores²²⁸.

OBJETIVOS

La Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC) es la principal causa de hemorragia cerebral lobar en la población de edad avanzada. Sin embargo, no existen hasta la fecha marcadores biológicos que nos permitan identificar pacientes con AAC o predecir su evolución en la práctica clínica habitual. Nuestra hipótesis es que existen marcadores proteicos de la enfermedad, asociados a al depósito de A β en vasos cerebrales y la disfunción cerebrovascular, que nos podrían ayudar a mejorar el diagnóstico y predecir el pronóstico de los pacientes con AAC, así como a profundizar en la fisiopatología que engloba la β -amiloidosis cerebral. La comprensión de la participación de esas proteínas en la agregación, toxicidad y localización cerebral de A β podría abrir nuevas perspectivas para un tratamiento modificador del curso de la enfermedad.

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son los siguientes:

- 1) Caracterización de la línea de ratones transgénicos APP23, en comparación al modelo 5xFAD, en términos neuropatológicos de AAC.
- 2) Búsqueda de nuevos biomarcadores involucrados en la acumulación vascular de A β a partir de un modelo experimental de β -amiloidosis cerebral con objetivo de validar su presencia en muestras de pacientes con AAC.
- 3) Análisis de biomarcadores candidatos en la AAC en el suero de una cohorte de pacientes con HIC lobar de etiología amiloidea.

MÉTODOS

A continuación se describe la metodología empleada en esta tesis doctoral. Puede encontrarse información más detallada en el apartado *Methods* de los correspondientes manuscritos en la sección de resultados.

1. Modelos animales

Los animales fueron mantenidos en condiciones de animalario, con temperatura y humedad controlada, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12h y con comida y bebida *ad libitum*. Los protocolos que se llevaron a cabo fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Vall d'Hebron (78/13, 89/17 CEEA) y se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la legislación española (RD 53/2013) y las directivas de la Unión Europea (86/609/EEC). El número de animales utilizados, así como el estrés y sufrimiento de los mismos durante la manipulación y experimentación, fueron reducidos al máximo. Los experimentos fueron llevados a cabo con ratones hermanos de las mismas camadas generados por cruces para la obtención de un mismo fondo genético.

1.1 Línea de ratones transgénicos APP23

Se trata de un modelo murino transgénico que sobreexpresa la proteína humana PPA con la doble mutación sueca (KM670, 671NL), bajo el control del promotor neuronal murino Thy-1 (B6.Cg-Tg (Thy1-APP) 3Somm/J)²¹¹. Los ratones fundadores de nuestra colonia fueron adquiridos a The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

1.2 Línea de ratones 5xFAD

Se trata de un modelo murino doble transgénico APP/PS1 que presenta 5 mutaciones ligadas con la EA familiar. Este modelo sobreexpresa las proteínas humanas PS1 y APP bajo el control del promotor neuronal murino Thy-1 (B6.Cg-Tg (APPSwFILon, PSEN1*M146L*L286V) 6799 Vas/Mmjax). Presenta las mutaciones suecas (K670N, M671L), Florida (I716V) y London (V717I) en PPA; y las mutaciones M146L y L286V en PS1. Los ratones fundadores de nuestra colonia fueron generosamente donados por el Dr. Santiago Rivera, Universidad de Marseille, Francia.

1.3 Mantenimiento de las colonias

Para el mantenimiento y expansión de ambas colonias, se cruzaron animales APP23 o 5xFAD hemocigotos con hembras *wild-type* (WT) del mismo fondo genético (C57BL/6) obtenidos de Janvier (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Se recogieron

pequeños fragmentos de cola de todos los animales para la obtención de DNA y se genotiparon en Transnetyx (Cordova, TN, USA). Los animales de ambas colonias se dejaron crecer y se mantuvieron en condiciones de animalario para obtener la cohorte final del estudio.

1.4 Seguimiento de las colonias para el análisis de supervivencia

Las curvas de supervivencia se calcularon en base a un número total de animales de: 432 ratones APP23, 90 ratones 5xFAD y 584 ratones WT C57BL/6. Los ratones APP23 y WT se siguieron hasta los 24 meses de edad, mientras que los ratones 5xFAD se siguieron hasta los 20 meses debido a la alta mortalidad observada a esta edad. Los datos de supervivencia se recogieron desde la fecha de inicio de la colonia en nuestro laboratorio, hasta marzo de 2021. La colonia APP23 comenzó en 2014, mientras que la colonia 5xFAD comenzó en 2018. La fecha de muerte se determinó como el día en que se encontró un ratón muerto o el día en el que el veterinario determinó que estaba moribundo y había que proceder a su eutanasia. Los ratones que se utilizaron para otros experimentos, y que por tanto, eutanasiados a una edad determinada, se incluyeron en el análisis de supervivencia como datos censurados.

1.5 Preparación de muestras ratón para análisis bioquímicos e histológicos

Los animales incluidos en el estudio se sacrificaron a diferentes edades y se obtuvieron muestras de tejido cerebral y plasma. Para ello, los animales fueron anestesiados con sedación de isoflurano al 5% con oxígeno con el fin de mantener un plano anestésico profundo y se procedió a su eutanasia por exsanguinación. Se extrajo sangre por vía intracardiaca y seguidamente se perfundió con una solución fría de salino. Finalmente se extrajo el cerebro y, en general, se separaron los dos hemisferios mediante un corte longitudinal. El hemisferio derecho fue congelado en nitrógeno líquido y posteriormente conservado a -80°C para análisis bioquímicos. El hemisferio izquierdo fue sumergido en formalina al 10% durante 48 horas y después fue incluido en parafina para los análisis histológicos. La preparación de los bloques parafinados fue realizada por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron.

1.6 Preparación de homogenados cerebrales de ratón

De cada hemisferio de ratón se obtuvieron fracciones de proteína soluble, membrana e insoluble. Para esta tesis doctoral, se ha utilizado la fracción soluble de cada

homogenado cerebral. El tejido cerebral se homogeneizó en 4 ml de solución salina tamponada con tris (TBS, del inglés, *tris buffered saline*, pH 7,4) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). A continuación, cada homogenado se centrifugó a 8000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se seleccionó como la fracción de proteína soluble. Las fracciones recolectadas se congelaron a -80°C hasta su uso. La concentración de proteína total en cada fracción se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

1.7 Microdissección láser y proteómica en muestras de cerebro de ratón

Se utilizaron secciones parafinadas de cerebro de 10 µm de grosor de ratones APP23 y WT de 24 meses de edad. Para la visualización de las placas neuríticas y de los vasos cerebrales positivos para Aβ se utilizó la tinción de Thioflavina S (ver sección 6.1 de métodos), que se une específicamente a estructuras tipo hoja-β plegada. Como control se seleccionaron vasos cerebrales de ratones WT mediante la tinción con Lectina (ver sección 6.3 de métodos), un marcador endotelial. Mediante microdissección láser se aislaron por un lado vasos positivos para Aβ, por otro lado placas neuríticas y finalmente, vasos cerebrales de ratones WT usando el objetivo 20x del microdisector LMD600 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Se recogió un área total de aproximadamente 10⁶ µm² en cada caso. El material microdisseccionado se recogió en tampón de lisis y los fragmentos se digirieron en péptidos para ser analizados por cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas Orbitrap en trampa iónica lineal. El análisis proteómico se llevó a cabo por la Unidad de Proteómica del Hospital Vall d'Hebron. Finalmente, la identificación proteica de los candidatos se llevó a cabo mediante el software Mascot (Matrix Science, London, UK).

1.8 Análisis de imagen ex vivo por RM

Para el análisis de imagen de los cerebros *ex vivo*, se procedió a su eutanasia por exsanguinación incluyendo alguna modificación en el protocolo anteriormente descrito. La perfusión se realizó en primer lugar con 40 ml de salino y seguidamente con 40 ml de paraformaldehído (PFA) al 4%. Una vez extraído el cerebro, éste se conservó en PFA al 4% durante 72 horas. Pasado ese tiempo, los cerebros se mantuvieron en una solución de tampón fosfato salino (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) con 0.01% de

Azida Sódica (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) para su mantenimiento un mínimo de 10 días hasta que se les realizó la RM.

Para la realización *ex vivo* de la RM, los cerebros se sumergieron en Galden®D05 PFPE (Solvay, Bollate, Italy), un disolvente fluorado que reduce la posible aparición de artefactos, y se introdujeron en un soporte hecho manualmente a medida. Las secuencias se obtuvieron utilizando un sistema de escáner horizontal de 7.5 Teslas (BioSpec 70/30USR, Bruker) en el Servicio de Resonancia Magnética de la Universidad Autónoma de Barcelona y las imágenes se adquirieron en secuencia ponderada en T2* con el software Paravision (Bruker). Los parámetros de imagen utilizados fueron: tiempo de repetición 700 ms, tiempo de eco 8 ms, matriz 160x160, campo de visión 1.28x1.28 cm² e intervalo de corte 0.3 mm. El tiempo de adquisición para un tamaño de vóxel de 0.08x0.08x0.03 mm³ fue de 22 minutos. Se obtuvieron un total de 28 cortes. Para la cuantificación de las lesiones hemorrágicas cerebrales se contaron las señales hipointensas en T2* y se clasificaron en función de su diámetro en microsangrados (50-300 µm) o hemorragias mayores (>300 µm). Para evitar contar la misma lesión hemorrágica varias veces, se controló cuidadosamente su presencia en los cortes cerebrales consecutivos.

2. Estudio de muestras de suero humano: AAC-HIC, EA y controles

Para la obtención de todas las muestras humanas de suero analizadas, se recogió la sangre periférica en tubos con EDTA y el suero se separó inmediatamente por centrifugación a 1500 g durante 15 minutos. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.1 Muestras de suero de pacientes AAC-HIC

Las muestras de suero de pacientes con HIC asociada a AAC fueron obtenidas de un estudio multicéntrico que lidera nuestro laboratorio. La cohorte está formada por pacientes que presentaban un diagnóstico clínico de AAC posible, probable o probable con confirmación patológica de acuerdo a los criterios de Boston modificados⁷⁹. Los pacientes se reclutaron en las unidades de neurología o ictus de 11 centros españoles diferentes.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes mayores de 55 años
- Haber sufrido al menos una HIC lobar
- No haber sufrido una HIC en estructuras profundas
- No estar en tratamiento con anticoagulantes

Los datos obtenidos de toda la cohorte incluyeron: codificación del paciente, fecha de inclusión, características demográficas (edad, sexo), factores de riesgo vascular relevantes (hipertensión, diabetes, dislipidemia) y hallazgos de imagen cerebral por RM. Las muestras de suero se recolectaron en la fase no aguda (al menos dos meses después de la última HIC) para evitar el proceso inflamatorio inicial.

Se obtuvo una RM cerebral de todos los participantes utilizando un sistema de escáner de cuerpo entero de 1.5 Teslas. Las imágenes obtenidas incluyeron secuencias axiales ponderadas en T1, T2, FLAIR y T2*-GRE. Todas las resonancias fueron evaluadas por el mismo neurorradiólogo del Hospital Vall d'Hebron, que era ciego a la información clínica y biológica. Entre las lesiones que se evaluaron se encuentran las siguientes:

- La HIC se definió como una lesión mayor de 5 mm de diámetro y con focos hipointensos en las imágenes ponderadas en T2*. Se determinó el número de HIC y su localización.
- Las microhemorragias cerebrales se definieron como lesiones menores de 5 mm de diámetro y se evaluaron de acuerdo a la escala *Brain Observer MicroBleed Scale*⁸⁸.
- La leucoaraiosis o LSB se definieron como lesiones de señal hiperintensas en secuencia ponderada en T2 y FLAIR a nivel subcortical y periventricular. Se evaluaron siguiendo la escala de Fazekas que puntúa el daño del 0 al 4²³³. Para este trabajo hemos considerado una puntuación ≥ 3 como extensa en ambas regiones. La puntuación se registró en el hemisferio no afectado por la hemorragia, excepto en los casos en que ambos hemisferios estaban afectados.
- Los EPVD se consideran lesiones hipointensas en T2 con una intensidad similar a la del LCR. Los EPVD se evaluaron en los ganglios basales y en el centro semioval y se clasificaron como moderados (≤ 20 EPVD) o graves (≥ 21 EPVD) según el número encontrado en las imágenes axiales de RM.

- La cSS se definió como el depósito de hemosiderina en las capas superficiales del córtex cerebral, mostrando hipointensidad en imágenes T2*-GRE. La distribución y gravedad de la cSS se clasificó como focal (restringida a ≤ 3 surcos) o diseminada (> 4 surcos)⁷⁹. No se incluye cSS si se observa contiguo a la HIC.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España (PR(AG)326/2014), y contó con la aprobación de los comités éticos de todos los centros participantes. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado firmado antes de la inclusión en el estudio.

2.2 Muestras de suero de pacientes con EA

Los pacientes con EA fueron reclutados en la Unidad de Demencias del Hospital Vall d'Hebron. Todos ellos presentaron un diagnóstico de EA probable de acuerdo a los criterios NIA-AA²³⁴. Los pacientes con EA no presentaban historia de lesiones hemorrágicas o ictus antes del reclutamiento. Estas muestras se reclutaron como controles del estudio de biomarcadores de AAC con el mismo protocolo aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica PR(AG)326/2014.

2.3 Muestras de suero de sujetos control

Los sujetos que formaron parte del grupo control se reclutaron entre los acompañantes o familiares de los pacientes. Fueron seleccionados según edad y sexo, y por no presentar ningún tipo de trastorno neurológico ni psiquiátrico, ni tampoco historia de lesiones hemorrágicas, ictus previos, demencia o deterioro cognitivo.

En la última parte de esta tesis doctoral donde se estudian los niveles circulantes de AQP4 y se asocian con las características radiológicas de la cohorte, los controles fueron seleccionados de la cohorte ISSYS (Investigación de Ictus Silenciosos en Hipertensos, un estudio de imágenes por resonancia magnética)²³⁵ ya que se sometieron a una RM cerebral en una visita de seguimiento y se conocían los datos radiológicos de los participantes. Los controles eran sujetos sanos sin antecedentes de ictus y se eligieron por no tener eventos hemorrágicos en la RM.

3. Estudio de muestras de LCR humano: AAC, EA y controles

Las muestras de LCR se obtuvieron mediante punción lumbar mediante procedimientos estándar. Se recogieron en tubos de polipropileno, se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos y almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.1 Muestras de pacientes con AAC

Las muestras de LCR de pacientes con AAC se obtuvieron gracias a una colaboración con el laboratorio del Dr. M. Verbeek de la Universidad de Radboud, Países Bajos. El diagnóstico clínico de AAC se basó en los criterios de Boston modificados⁷⁹. Se incluyeron un total de 16 pacientes con diagnóstico de AAC probable, 2 pacientes con AAC inflamatoria, 4 pacientes con AAC de etiología mixta, y 1 paciente con AAC familiar de tipo *Dutch*, HCHWA-D. Se conocían los niveles de A β 40, A β 42 y tau total y fosforilada en el LCR de todos los pacientes incluidos en el estudio.

3.2 Muestras de pacientes con EA

Los pacientes con EA fueron reclutados en la Unidad de Demencias del Hospital Vall d'Hebron. Todos ellos presentaron un diagnóstico de EA probable de acuerdo a los criterios NIA-AA²³⁴. Los pacientes con EA no presentaban historia de lesiones hemorrágicas o ictus antes del reclutamiento. Se conocían los niveles de A β 42 y tau total y fosforilada en el LCR de todos los pacientes incluidos en el estudio.

3.3 Muestras de controles

Los sujetos que formaron parte del grupo control se reclutaron entre la cohorte de la Universidad de Radboud y la cohorte de la Unidad de Demencias del Hospital Vall d'Hebron. Los controles de las dos cohortes se unificaron para el análisis ya que no se encontraron diferencias significativas en la edad o el sexo ni en el perfil de biomarcadores de A β 42, tau total ni tau fosforilada del LCR entre ambas cohortes. Los sujetos control se sometieron a la obtención de LCR por motivos diagnósticos y se seleccionaron por no presentar una historia clínica asociada a ictus, ni evidencia clínica de deterioro cognitivo o enfermedad neurodegenerativa y por tener un perfil de biomarcadores de LCR normal para los parámetros analizados en la práctica clínica habitual. El estudio fue aprobado por los comités de éticos locales y todos los sujetos incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado previo.

4. Estudio de muestras cerebrales *post mortem* de AAC y controles

Se seleccionaron doce casos en los que se había realizado un estudio neuropatológico *post mortem* en el Departamento de Anatomía Patología del Hospital Vall d'Hebron. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los pacientes o de sus representantes para participar en este protocolo antes de la donación del tejido. Para los casos control se recibió el permiso de exención del Comité de Ética del Hospital Vall d'Hebron (PR(IR)173/2019). Todas las muestras se obtuvieron de 2 a 20 horas tras el fallecimiento del paciente y las muestras se fijaron en formalina al 10% durante 3-4 semanas. Posteriormente se realizó un examen macroscópico y se seleccionaron áreas cerebrales corticales. Los bloques incluidos en parafina se cortaron en secciones de 4 μm para su análisis por inmunohistoquímica. A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó un examen neuropatológico completo. Brevemente, la clasificación de AAC tipo I y tipo II se realizó de acuerdo con los criterios descritos por Thal *et al.*²³⁷, y las lesiones de AAC se clasificaron en grados siguiendo los criterios descritos por Greenberg y Vonsattel²³⁸. La patología de EA se evaluó de acuerdo con los criterios NIA-AA²³⁹ (puntuación ABC), combinando las fases de Thal²³⁷ (clasificación de A β), el estadio de Braak¹⁴⁵ (puntuación de ovillos neurofibrilares) y los criterios CERAD²⁴⁰ (puntuación de placas neuríticas).

5. Cultivos celulares

A lo largo de esta tesis se ha trabajado con un cultivo primario de células del músculo liso de los vasos cerebrales humanos (*HBVSMC*, *del inglés, Human Brain Vascular Smooth Muscle Cells*).

5.1 Mantenimiento del cultivo celular

Las HBVSMCs fueron adquiridas a InnoProt (Derio, Bizkaia, Spain). Las células se cultivaron en medio completo *Dulbecco-modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*), 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina y se mantuvieron en una incubadora con CO_2 al 5% a 37°C. Las células se sembraron en un T-flask de 75 cm^2 de área (T-75) recubierto con poli-L-lisina (2 $\mu\text{g/cm}^2$, Sigma-Aldrich) y una vez alcanzada una confluencia celular de aproximadamente el 80% se procedió al subcultivo de las mismas.

5.2 Subcultivo

Una vez alcanzada la confluencia celular, las HBVSMCs se trataron con una solución de tripsina (Tripsina-EDTA (1x), Sigma-Aldrich) durante 2 minutos a 37°C. Una vez disociadas las células, la acción de la tripsina se neutralizó añadiendo el doble de volumen de medio de cultivo completo y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió cuidadosamente en medio completo y se procedió al conteo celular mediante el principio de exclusión del colorante *Trypan Blue* en una cámara de Neubauer. Una vez se conoce el número de células, la suspensión inicial se diluye con el fin de obtener la densidad celular adecuada para sembrar nuevas placas o se procede a la congelación de nuevos viales para su conservación a largo plazo.

5.3 Almacenaje de células (congelación y descongelación)

Para la preservación de células a largo plazo se utiliza un agente crioprotector como el dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich). Una vez alcanzada una alta confluencia celular, se procede a la tripsinización de las mismas como en un subcultivo rutinario. Tras el conteo celular, las células se resuspenden en medio de cultivo con una concentración final de 20% de FBS y 10% de DMSO y se deja actuar durante 15-20 minutos. Generalmente, las células se congelan a una densidad de 1/3-5, por lo que de un flask T-75 se suelen preparar de 3 a 5 crioviales para congelar. Finalmente los crioviales se congelan a -80°C durante un periodo máximo de 3 meses y posteriormente se pasan a un tanque de nitrógeno líquido donde se almacenan a largo plazo.

Para el proceso de descongelación, los crioviales se extraen del tanque de nitrógeno y se introducen rápidamente en un baño a 37°C. Una vez descongelada la suspensión celular, se añade cuidadosamente en el mismo vial 1 ml de medio completo y se transfiere el contenido a un flask T-75 que contiene 10 ml de medio completo previamente atemperado a 37°C. A las 24 horas se cambia el medio para eliminar el DMSO y los posibles restos celulares. A partir de este punto, las células se mantienen como se ha explicado anteriormente.

5.4 Tratamientos de las células

Para los tratamientos llevados a cabo en este trabajo, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 o 48 pocillos previamente tratadas con poli-L-lisina a una densidad de 30.000 y 15.000 células por pocillo respectivamente. Se mantuvieron 48 horas en medio

completo antes de iniciar el tratamiento y todos los estudios se llevaron a cabo privando de FBS a las células.

5.4.1 Tratamiento con A β 40 y A β 40-Dutch

Las HBVSMCs fueron tratadas con dos péptidos de A β 40 diferentes; el péptido A β 40 (AnaSpec, San Jose, CA, USA), y el péptido A β 40-Dutch (A β 40-D, AnaSpec), que contenía la mutación *Dutch* E22Q. Los péptidos liofilizados se disolvieron en hexafluoruro-2-isopropanol (Sigma-Aldrich) durante 6 horas y fueron divididos en alícuotas de 250 μ g. El disolvente orgánico se dejó evaporar durante toda la noche y las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los tratamientos con las diferentes variantes del péptido A β 40 se realizaron siempre a una concentración final de 25 μ M disolviéndose previamente en agua.

5.4.2 Tratamiento con rh-MFGE8

Para evaluar el efecto exógeno de MFG-E8, las células se trataron con proteína recombinante humana rh-MFG-E8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La proteína fue resuspendida a una concentración inicial de 100 μ g/ml en una solución de PBS. Las HBVSMCs fueron tratadas simultáneamente con 2 μ g/ml de rh-MFG-E8 y 25 μ M de A β 40-D durante 5 días en medio DMEM sin FBS. Pasado ese tiempo, se evaluó la viabilidad celular de las mismas.

5.5 Silenciamiento con siRNA MFGE8

Para el silenciamiento del gen de MFG-E8 se usó el kit comercial Accell SMART pool siRNA (GE Dharmacon, Lafayette, USA) que consistía en un pool de 4 RNAs de interferencia de cadena corta (siRNA: *small interfering RNA*). Como control del silenciamiento se utilizó una secuencia de siRNA que carecía de mRNA diana, designado como NT-siRNA (*del inglés, non-targeting siRNA*). Los siRNAs fueron resuspendidos a una concentración inicial de 100 μ M como indicaba el protocolo de la casa comercial. Finalmente las HBVSMCs fueron tratadas con 1 μ M de siRNA de MFG-E8 o NT-siRNA durante 48 horas. Pasado este tiempo, el medio de cultivo fue sustituido por medio fresco (sin FBS) y las células fueron tratadas posteriormente con 25 μ M de A β 40-D durante 48 horas más.

5.6 Obtención de muestras y viabilidad de los cultivos celulares

5.6.1 Preparación de lisados celulares

Los lisados celulares se obtuvieron con tampón de lisis recién preparado que contenía Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, BRIJ-35 al 0,05%, NaN₃ al 0,02%, Triton X-100 al 1%, fluoruro de fenilmetanosulfonilo al 1% (Sigma-Aldrich) y aprotinina al 0,5% (Sigma-Aldrich). La concentración de proteína total se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA. Los lisados celulares se conservaron a -80°C hasta su uso.

5.6.2 Viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico del MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolo). Este ensayo consiste en la reducción dependiente del MTT a formazán, de color violeta. Para ello, las células se incubaron con 0.5 mg/ml de MTT disuelto en agua destilada durante 90 minutos, en oscuridad y a 37°C. Posteriormente se aspiró el medio y se añadió 250 µl de DMSO. La cantidad de cristales de formazán formados se cuantificó leyendo la absorbancia a 560 nm y 620 nm usando el lector de placas Synergy™ Mx Microplate reader (BioTek Instruments Inc.). La viabilidad celular se expresó como porcentaje respecto a la condición control.

6. Métodos generales

6.1 Tinción con ThS

La Thioflavina S (ThS, Sigma-Aldrich) se une de forma específica a estructuras con una conformación tipo hoja-β plegada. Por ello, es capaz de unirse a oligómeros y fibras Aβ, pero no a monómeros, aumentando así la emisión de fluorescencia. Las secciones se desparafinaron durante 1 hora a 65°C y se hidrataron sumergiéndolas en diluciones seriadas de etanol. Tras ello, se incubaron durante 30 segundos en ThS al 1% en etanol al 75%. Se eliminó el exceso de ThS, y las secciones fueron sumergidas nuevamente en ThS al 0,1% en etanol al 75% durante 1 minuto. Tras dos lavados con etanol 75%, las muestras fueron deshidratadas y contrateñidas con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), permitiendo así la visualización de los núcleos celulares. En el caso de que las muestras se utilizaran para microdissección láser, no se procedió a la deshidratación ni contrateñimiento de las muestras con DAPI. En su lugar, se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en oscuridad hasta su procesamiento. La plataforma Panoramic 250 (3DHitech, Budapest, Hungary) se utilizó con un objetivo

de 20x para digitalizar y escanear las secciones y las imágenes se capturaron utilizando el software Case Viewer (3DHistech).

Para la cuantificación de los depósitos positivos para ThS se utilizó el software ImageJ (National Institutes of Health, USA). Las imágenes se transformaron a escala de grises de 32 bits y se delimitó y calculó el área de interés a estudiar (todo el área del cerebro exceptuando el bulbo y el cerebelo). A continuación, se estableció y ajustó un valor umbral de pixel común a todas las imágenes, y finalmente se cuantificó el número de depósitos por área, el área ocupada por los depósitos, y el tamaño medio de los depósitos en la región cerebral seleccionada.

6.2 Tinción con Resorufina

La resorufina (Sigma-Aldrich) es un compuesto que se une específicamente a los depósitos cerebrovasculares A β , lo que permite discriminar entre las placas neuríticas y los depósitos vasculares de A β ¹¹⁰. Las muestras se desparafinaron durante 1 hora a 65°C y se hidrataron sumergiéndolas en diluciones seriadas de etanol. Tras diversos lavados con PBS y PBS suplementado con TritónX-100 al 0,2% (PBST), las muestras se tiñeron con 1 mM de resorufina durante 5 minutos en oscuridad. Por último, las secciones se lavaron y deshidrataron para finalmente ser fijadas con DAPI, tinción de contraste. La plataforma Pannoramic 250 se utilizó con un objetivo de 20x para digitalizar y escanear las secciones y las imágenes se capturaron utilizando el software Case Viewer.

Para la cuantificación de los depósitos vasculares positivos para resorufina se contabilizaron manualmente los vasos en las secciones digitalizadas con el software Case Viewer. Finalmente, con el software ImageJ se calculó el área de interés a estudiar (todo el área del cerebro exceptuando el bulbo y el cerebelo) y los datos se representaron como número de vasos positivos entre el área seleccionada.

6.3 Tinción con Lectina

La Lectina de tomate es una proteína obtenida del tomate (*Lycopersicon esculentum*) que se une específicamente a las glicoproteínas de las membranas basales de las células endoteliales, permitiendo así la visualización de los vasos sanguíneos cerebrales. Las muestras se desparafinaron durante 1 hora a 65°C y se hidrataron sumergiéndolas en diluciones seriadas de etanol. A continuación, las secciones se

incubaron durante toda la noche en presencia de Lectina (Vector Laboratories, 1:200) y finalmente se hicieron tres lavados con PBST. Las secciones se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en oscuridad hasta su procesamiento por microdissección laser.

6.4 Tinción de Prussian Blue

Para la visualización de los microsangrados en el cerebro de los ratones se utilizó una tinción específica para el hierro férrico. Esta tinción, conocida como tinción de Perls o Prussian Blue, permite la visualización de precipitados de color azul por la reacción del ácido clorhídrico con el ferrocianuro de potasio, generando precipitados de ferrocianuro férrico (azul de Prusia). Para ello, las muestras se desparafinaron durante 1 hora a 65°C y se hidrataron sumergiéndolas en diluciones seriadas de etanol. Las secciones se tiñeron con un kit comercial de Prussian Blue (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones se incubaron con una mezcla a partes iguales de ferrocianuro de potasio y ácido clorhídrico durante 40 minutos. Tras diversos lavados con agua destilada, las muestras se contratiñeron con Fast Red durante 5 minutos y se montaron con DPX (Sigma-Aldrich). La plataforma Panoramic 250 se utilizó con un objetivo de 20x para digitalizar y escanear las secciones y las imágenes se capturaron utilizando el software Case Viewer.

6.5 Inmunohistoquímica

Para las tinciones inmunohistoquímicas las muestras se desparafinaron 1 hora a 65°C, se rehidrataron y trataron con citrato sódico (10 mM, Tween20 al 0,05%, pH 6) como método de desenmascaramiento de antígeno durante 30 minutos a 95°C. Las muestras se bloquearon con suero de cabra al 10% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Tras tres lavados con TBST, las secciones fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos para bloquear las peroxidasas endógenas. A continuación se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con biotina contra IgG de la especie de procedencia del primario, a una durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de otra incubación de 1 hora con streptavidina conjugada con enzima peroxidasa (HRP, *del inglés, horseradish peroxidase*). Finalmente las muestras se trataron con diaminobencidina (DAB; Dako, Dinamarca) y se sumergieron 20 segundos en una solución de hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich)

utilizada como tinción de contraste. Como medio de montaje se utilizó DPX. La plataforma Panoramic 250 se utilizó con un objetivo de 20x para digitalizar las secciones y las imágenes se capturaron utilizando el software Case Viewer. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA

ANTICUERPO	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN	PROVEEDOR
ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Aβ-4G8	Ratón	1:5000	Biologend
Aβ-40	Conejo	1:5000	Sigma-Aldrich
Aβ-42	Conejo	1:5000	Sigma-Aldrich
MFG-E8	Conejo	1:1000	Thermo Fisher
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Anti-IgG Ratón	Cabra	1:1000	GE Healthcare
Anti-IgG Conejo	Cabra	1:1000	GE Healthcare

Para el estudio inmunohistoquímico en tejido *post mortem*, los depósitos positivos para A β y para MFG-E8 en placas parenquimatosas y en la vasculatura cerebral de secciones de tejido cerebral occipital humano se cuantificaron en un área equivalente de 385-400 mm² en todas las secciones. Se otorgó una puntuación de 0 cuando no se detectó señal (ausencia de depósitos); puntuación de 1 para una detección leve (1-50 depósitos); puntuación de 2 para una detección moderada (51-100 depósitos) y una puntuación de 3 para una detección intensa (>100 depósitos). La evaluación fue realizada independientemente por dos investigadores que desconocían la distribución de los grupos diagnósticos.

6.6 Inmunofluorescencia

Para la detección por inmunofluorescencia de las diferentes proteínas, se usaron secciones de cerebro parafinadas de ratones APP23 y WT de 24 meses de edad. Las muestras se incubaron 1 hora a 65°C, se rehidrataron y trataron con ácido fórmico al 70% como método de desenmascaramiento de antígeno durante 30 minutos. Las muestras se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA, *del inglés, bovine serum albumin*; Sigma-Aldrich) al 3% en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes. Tras tres lavados con PBST, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor durante 1 hora a temperatura

ambiente. Finalmente, las muestras se deshidrataron y se utilizó DAPI como tinción de contraste y medio de montaje. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000 o con un microscopio de fluorescencia recto convencional Olympus BX61. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN INMUNOFLUORESCENCIA

ANTICUERPO	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN	PROVEEDOR
ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Aβ-4G8	Ratón	1:1000	Biologend
MFG-E8	Cabra	1:50	R&D Systems
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Anti-IgG AlexaFluor 488	Cabra	1:500	Thermo Fisher
Anti-IgG AlexaFluor 568	Cabra	1:500	Thermo Fisher

6.7 Inmunocitoquímica

Se cultivaron las HBVSMCs sobre cubreobjetos de cristal recubiertos de poli-L-lisina a una densidad de 15.000 células/ml en placas de cultivo de 24 pocillos durante 2 días. Las células se fijaron durante 15 minutos con PFA al 4% durante 20 minutos y se bloquearon con BSA al 3% en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados con PBST, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 568 o Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher) a una dilución 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se montaron los cubreobjetos con DAPI como tinción de contraste. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio láser confocal Zeiss LSM 980.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MFG-E8 (1:50, Thermo Fisher) y anti-actina del músculo liso (1:100, SMA, *del inglés, smooth muscle actin*; Abcam, Cambridge, UK).

6.8 Western blot

La determinación de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot. La valoración de la concentración de proteína de cada una de las muestras se realizó mediante el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA. Se analizaron concentraciones iguales de proteína de homogenados cerebrales de ratón (50 μ g) o

lisados celulares (10 µg) mediante electroforesis SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante la tinción con Rojo *Ponceau* y posteriormente se procedió al bloqueo de las membranas durante 1 hora con leche desnatada al 10% en PBST. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados de 10 minutos con PBST, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados conjugados con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las bandas de proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia usando el kit *Pierce ECL Western Blotting Lumino/Enhancer* y *Stable Peroxidase* (Thermo Fisher). Se utilizó el software Image J para cuantificar la cantidad de proteína midiendo la intensidad de las bandas. Todas las mediciones de proteínas se dividieron por la β -actina para su normalización. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MFG-E8 (1:50, Thermo Fisher) y anti- β actina (1:10000, Sigma-Aldrich).

6.9 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se utilizaron ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la cuantificación de los niveles séricos de AQP4 y MFG-E8 y para la cuantificación de la concentración de MFG-E8 en el LCR de los grupos de estudio. Los ELISAS comerciales utilizados fueron AQP4 *Human Kit* (Cusabio Biotech., Wuhan, China) y *Human MFG-E8 Quantikine Kit* (Bio-Techne R&D Systems). Los resultados finales se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante en un lector de microplacas Synergy™ Mx (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Cada muestra se analizó por duplicado y se utilizaron los valores medios para el análisis estadístico, considerando únicamente los replicados con un coeficiente de variación menor al 20%. Para unir los resultados entre diferentes placas se usaron muestras repetidas y pools de suero humano comerciales (Sigma-Aldrich). Solo se consideraron aquellos resultados con un coeficiente de variación menor al 20% en los sueros comerciales y en las muestras repetidas entre las diferentes placas.

6.10 PCR cuantitativa

La cuantificación del mRNA de proteínas específicas se llevó a cabo mediante la PCR cuantitativa o *real-time PCR* (RT-qPCR). Se aisló el RNA total de las HBVSMC utilizando

el kit *SpeedTools* (Biotools, Madrid, Spain) y los cDNAs correspondientes se sintetizaron mediante transcripción inversa utilizando el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las condiciones de retrotranscripción fueron 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 37°C, 60 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C en el termociclador. Los niveles de mRNA se cuantificaron usando las sondas TaqMan para MFG-E8 (Hs00983890_m1, Thermo Fisher) y PPIA (Peptidilprolil isomerasa A, Hs99999904_m1, Thermo Fisher). Finalmente se procedió a la amplificación a tiempo real utilizando el sistema de detección de secuencias Prism 7900HT (Applied Biosystems). Los resultados se procesaron mediante el programa específico *ABI Prism 7900HT SDS Software*. La expresión génica se normalizó a los niveles de PPIA, utilizado como gen endógeno, y los valores de cuantificación relativa se calcularon utilizando la ecuación de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)^{241,242}.

7. Análisis estadísticos

Para los resultados en modelos experimentales se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para analizar la normalidad de las variables continuas. En experimentos con animales, las diferencias significativas entre dos grupos experimentales con distribución normal se determinaron mediante la prueba t de Student. El efecto del genotipo (G) y la edad (A, *aging*) se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) bidireccional con la prueba post hoc de Bonferroni. Las curvas de supervivencia se calcularon mediante el método de Kaplan-Meier y la regresión de Cox se utilizó como análisis multivariante de la supervivencia. En experimentos con cultivos celulares, las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante ANOVA unidireccional con el test post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Para los estudios en muestras humanas, se utilizaron estadísticos descriptivos para definir los datos demográficos y las características clínicas de los grupos de diagnóstico (pacientes con AAC y/o pacientes con EA y controles). Para las variables categóricas se realizaron tablas de contingencia y pruebas de Chi-cuadrado. La distribución de las variables continuas se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En las variables con distribución normal se realizó ANOVA seguido del test de Tukey. En las variables de distribución no normal, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparaciones uno a uno y la prueba de Kruskal-Wallis con el test post hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Las correlaciones entre dos variables continuas se calcularon como rho de Spearman o correlación de Pearson en función de la normalidad de las variables. Los datos se

expresan como la media \pm SEM para distribuciones normales o como la mediana (rango intercuartílico) para distribuciones no normales. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$

RESULTADOS

**Impact of Cerebral Amyloid Angiopathy in Two Preclinical Mice
Models of Cerebral β -Amyloidosis: A Neuropathological Study**

IMPACT OF CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY IN TWO PRECLINICAL MICE MODELS OF CEREBRAL β -AMYLOIDOSIS: A NEUROPATHOLOGICAL STUDY

Paula Marazuela^{†1}, Berta Paez-Montserrat^{†1}, Anna Bonaterra-Pastra¹, Montse Solé¹, Mar Hernández-Guillamon^{1,*}

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

[†] These authors contributed equally to this work

* Corresponding author: mar.hernandez.guillamon@vhir.org

ABSTRACT

Pathological accumulation of parenchymal and vascular amyloid-beta ($A\beta$) are the main hallmark of Alzheimer's disease (AD) and Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA), respectively. Emerging evidence raises an important contribution of vascular dysfunction in AD pathology that could partially explain the failure of anti- $A\beta$ therapies in this field. Transgenic mice models of cerebral β -amyloidosis are essential to a better understanding of the mechanisms underlying amyloid accumulation in the cerebrovasculature and its interactions with neuritic plaque deposition. Here, our main objective was to evaluate the progression of both parenchymal and vascular deposition in APP23 and 5xFAD transgenic mice with age and sex. Survival analyses revealed a genotype-dependent increase in mortality in both APP23 and 5xFAD mice compared to WT mice, with sex differences in mortality only observed in the APP23 transgenic mice. Furthermore, a significant age-dependent accumulation of extracellular $A\beta$ deposits was evidenced in both transgenic models, with a greater increase in APP23 females. Finally, we confirmed that CAA pathology was more prominent in the APP23 mice, demonstrating a higher progression of $A\beta$ -positive vessels with age, but not linked to sex, and detecting a pronounced burden of cerebral microbleeds (cMBs) by magnetic resonance imaging (MRI). In contrast, 5xFAD did not present CAA, as shown by the negligible $A\beta$ presence in cerebral vessels and the occurrence of occasional cMBs comparable to WT mice. In conclusion, the APP23 mouse model is an interesting tool to study the overlap between vascular and parenchymal $A\beta$ deposition and to evaluate future disease-modifying therapies before its translation to the clinic.

Keywords: APP23, 5xFAD, survival curve, sex, age, cerebral β -amyloidosis, preclinical MRI, cerebral microbleedings

INTRODUCTION

Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA) is a major cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) in the elderly, as well as an important contributor to age-related cognitive decline¹⁻³. CAA is strongly associated with the occurrence of lobar ICH and other specific hemorrhagic magnetic resonance imaging (MRI) markers of small vessel disease, including lobar cerebral microbleeds (CMBs) and cortical superficial siderosis⁴. The most common form of CAA results from the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) protein in the walls of cerebral arteries, arterioles and capillaries, leading to smooth muscle cell degeneration and cerebrovascular dysfunction^{5,6}. The prevalence of CAA pathology increase in the presence of dementia and is particularly high in patients with Alzheimer's disease (AD)^{7,8}. Remarkably, whereas epidemiological studies have reported higher AD risk in females⁹⁻¹¹, no sex-specific differences in CAA have been described^{12,13}. AD is the most common cause of dementia and it is characterized by the deposition of extracellular $A\beta$ (neuritic plaques) and the intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau protein (neurofibrillary tangles)^{14,15}. $A\beta$ peptide derives from the proteolytic cleaved of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretases, which results in peptides typically 40 or 42 amino acids length ($A\beta_{40}$ or $A\beta_{42}$, respectively)^{16,17}. $A\beta_{42}$ peptides are mainly deposited in neuritic plaques, whereas $A\beta_{40}$ is the predominant peptide accumulated in the cerebral vasculature^{18,19}. The shared role of cerebral $A\beta$ deposition appears as a crucial event in both CAA and AD pathologies, although the overlap between these two diseases is not completely elucidated²⁰. In this regard, the interactions between both pathologies have several implications in their treatment: although anti- $A\beta$ antibodies have been widely tested in AD clinical trials, their success has been limited²¹⁻²⁴, partially, due to the incidence of vascular complications detected as MRI abnormalities (ARIA, Amyloid Related Imaging Abnormalities). The mechanisms that underlie ARIA are not fully understood, but available evidences suggests that antibody-mediated breakdown of neuritic plaques releases $A\beta$ that is then deposited in vessels, leading to increased CAA and impaired perivascular clearance²⁰. Although there is debate about the clinical implication of ARIAs, the use of immunotherapy in AD, and especially in CAA, has been delayed. In addition, currently, no proven effective treatment is available for CAA and the only clinical measures adopted are based on ICH prevention to avoid its recurrence^{25,26}.

Over the past years, efforts in the field of cerebral β -amyloidosis have been focused on the development of animal models that mimic the aspects of sporadic AD-like pathology to understand the underlying pathophysiological mechanisms and to evaluate the safety and efficacy of therapeutic drugs before the transition to the clinic. However, CAA models have been less explored. Since rodents do not spontaneously develop AD or CAA, a variety of transgenic mice models primarily overexpressing the human APP or presenilin-

1 (PS1) genes has been generated harboring familial Alzheimer's disease mutations (FAD)^{27–29} or familial CAA mutations^{30–32}. Our hypothesis is that the characterization of the progress of both AD and CAA pathological hallmarks in different mouse models of cerebral β -amyloidosis will provide important insights for the study of the overlap and disparities between both diseases, which might have implications for the accuracy in the diagnosis and might offer specific therapeutic opportunities for CAA or AD in the future. In particular, in this study we aimed to compare neuropathological features of CAA in two widely-known transgenic mice models of cerebral β -amyloidosis: the APP23 and 5xFAD transgenic mice. APP23 transgenic mice have a 7-fold overexpression of human APP751 isoform bearing the pathogenic Swedish mutation (K670N/M671L) under the control of the murine brain and neuron-specific thymocyte antigen-1 (Thy-1) promoter³³. On the other hand, 5xFAD mice overexpress the human APP695 isoform and the human PS1 with a total of five AD-linked mutations: the Swedish (K670N/M671L), Florida (I716V), and London (V717I) mutations in APP, and the M146L and L286V mutations in PS1, under the control of the murine Thy-1-promoter³⁴.

The first purpose of this study was to evaluate the progression of parenchymal A β load and CAA burden in the APP23 and 5xFAD mice models according to age and sex. Next, the specificity of A β peptides (A β 40/A β 42) present in plaques or cerebral vessels was studied. Finally, vascular damage was determined by analyzing the presence of cerebral microbleeds (cMBs) detected by MRI in brains from aged 5xFAD and APP23 mice. The study and contrast of the two models will allow a more adequate selection of the type, age and sex of experimental cohorts to carry out more precise preclinical studies according to the target in each case.

MATERIAL AND METHODS

Transgenic Animals

All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Vall d'Hebron Research Institute (78/13, 89/17 CEEA) and conducted in compliance with Spanish legislation (RD 53/2013) and with the Directives of the European Union (86/609/EEC). APP23 mice (B6.Cg-Tg (Thy1-APP) 3Somm/J) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and 5xFAD mice (B6.Cg-Tg (APPSwFILon, PSEN1*M146L*L286V) 6799 Vas/ Mmjax) were generously provided by Dr. Santiago Rivera, Marseille University, France. Male hemizygous APP23 and 5xFAD mice with the same genetic background (C57BL/6) were backcrossed with female C57BL/6 mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), and the genotype was tested by Transnetyx (Cordova, TN, USA). Male and female APP23, 5xFAD mice and the wild-type (WT) littermates were aged in the animal facility of our institution to

obtain the final study cohort. Mice were housed in a climate-controlled environment on a 12/12 hours light/dark cycle with food and water *ad libitum*. The number of mice per group is specified in each figure.

Survival curves were calculated based on the three colonies formed by 432 APP23 mice, 90 5xFAD mice, and 584 WT C57BL/6 mice. The lifespan of these mice was recorded from the initial foundation of the colony (from 2014 in the APP23 and 2018 in the 5xFAD colony) until March 2021. APP23 and WT mice were followed over their lifespan up to 24-month-old, while 5xFAD mice were followed up to 20-month-old due to the high mortality observed at this age. The dates of birth and death were recorded for each mouse and lifespan was calculated in months. The date of death was determined as the day a mouse was found dead or determined to be moribund by a veterinarian. Those mice that were used for separate experiments were included in the longevity analysis as censored data.

Tissue processing for histological analysis

For tissue collection, mice were deeply anesthetized under isoflurane flow and transcardially perfused with 25 ml of ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Brains were rapidly removed from the skull and divided into hemispheres. One hemisphere was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing for biochemical analyses, and the other hemisphere was fixed in 10% formalin for 48 hours before paraffin embedding.

Tissue processing for Magnetic Resonance Imaging

Transgenic male APP23, 5xFAD mice and WT littermate controls were aged to 20 months and euthanized to perform *ex vivo* brain magnetic resonance imaging (MRI). Briefly, animals were deeply anesthetized and transcardially perfused with 40 ml of ice-cold PBS followed by 40 ml of 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were carefully removed from the skull, immersed in PFA for 72 hours and then rehydrated in PBS preserved with 0.01% sodium azide at 4°C for a minimum of 10 days for tissue stabilization.

MRI protocol and analysis

All *post mortem* brains were scanned on a 7T horizontal magnetic system (Bruker BioSpec 70/30 USR, Ettlingen, Germany) in the joint nuclear magnetic resonance facility of the Universitat Autònoma de Barcelona. Samples were immersed in Galden®D05 (Solvay, Bollate, Italy), a fluorinated liquid to reduce susceptibility artefacts and placed into a custom-built brain holder for imaging. T2*-weighted images were obtained in coronal planes with the operational software Paravision (Bruker) using the following parameters: repetition time 700 ms, effective echo time 8 ms, matrix size 160 x 160, field

of view 1.28 x 1.28 cm², slice thickness 0.3 mm, and number of slices 28. The total acquisition time for a voxel of a size of 0.08x0.08x0.3 mm³ was 22 minutes. For MRI quantification, hypointense signals on T2* were counted as hemorrhages and classified as cerebral microbleeds (50-300 µm diameter) or larger hemorrhages (>300 µm). To avoid counting the same hemorrhagic lesion multiple times, its presence was carefully controlled over several consecutive slices. After *ex vivo* scanning, all brains were fixed and paraffin-embedded for future tissue histological examinations.

Thioflavin S staining

Fibrillar A β deposits were quantified by Thioflavin S (ThS) staining in sagittal brain paraffin sections of APP23, 5xFAD mice and littermate controls for both sexes at different ages (from 4- to 24-month-old). After deparaffinization for 1 hour at 65°C and rehydration, sections were immersed in 1% ThS solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) dissolved in 75% ethanol for 30 seconds. The excess of ThS was removed and slices were re-immersed in 0.1% ThS for 1 min, dehydrated and mounted in DAPI-containing mounting media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for nuclei counterstaining. The Panoramic 250 scanner (3DHitech, Budapest, Hungary) was used at 20x objective to digitize the slides and images were captured using Case Viewer Software (3DHitech). To quantify the number of ThS-positive deposits, images were converted to 32-bit grayscale and the brain region of interest was delimited (whole brain section except for the olfactory bulb and cerebellum). The threshold was then adjusted to reduce the background. A common pixel threshold value was applied to all the images. Finally, the number of total ThS-positive deposits was quantified and divided by the selected area (pixels²). The average size of the deposits (µm²) and the area occupied by the deposits (%) were also calculated using NIH ImageJ software.

Resorufin staining

For the specific detection of A β -positive vessels, resorufin staining was performed in paraffin-embedded mice brain sections following the protocol described by Han et al³⁵. Briefly, all samples were deparaffinized, washed 3 times in PBS and permeabilized in PBS-0.2% Triton X-100 (PBST) for 30 minutes. Samples were then immersed in 1 mM resorufin (Sigma-Aldrich) dissolved in PBST for 5 minutes. After rinsing with PBS, samples were rinsed with PBS-50% ethanol for 3 minutes and dehydrated. Finally, DAPI-containing mounting media (Vector Laboratories) was used as contrast staining. Samples were digitized at 20x objective using the Panoramic 250 scanner (3DHitech) and the number of positive vascular deposits were manually determined in the selected area. Data are expressed as the number of A β -positive deposits per area (pixels²). Images were captured using Case Viewer Software (3DHitech).

A β peptide immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on consecutive 5 μ m-thick sagittal paraffin sections from 16-month-old female APP23 and 5xFAD mice. All samples were deparaffinized, rehydrated, and incubated with citrate buffer to improve the antigen exposition (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH=6) for 30 minutes at 95°C. Sections were then blocked in 10% goat serum in tris buffered saline (TBS) supplemented with 0.2% TritonX-100 (TBST, Sigma-Aldrich) at room temperature for 1 hour followed by overnight incubation with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-4G8 (1:5000, Biolegend, San Diego, CA, USA), rabbit polyclonal anti-A β 40 (1:5000, #AB5074P, Millipore, Temecula, CA, USA) and rabbit polyclonal anti-A β 42 (1:5000, #AB5078P, Millipore). After rinsing, sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 15 minutes to block the endogenous peroxidases. Samples were then incubated with biotinylated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG (1:1000, Vector Laboratories) at room temperature for 1 hour followed by streptavidin-horseradish peroxidase (HRP; 1:1000, Vector Laboratories) incubation. Finally, diaminobenzidine (DAB; Dako, Denmark) was applied to the samples and the sections were immersed in Harris hematoxylin solution (Sigma-Aldrich) used as contrast staining. Samples were dehydrated and DPX (Sigma-Aldrich) was used as a mounting medium. The Panoramic 250 scanner (3DHitech) was used at 20x objective to digitize the histological slides and the images were captured using Case Viewer Software (3DHitech).

Prussian Blue staining

After *ex vivo* imaging, brains were paraffin-embedded and sliced in 5- μ m thick coronal sections. Prussian Blue staining was performed to detect the presence of cerebral microbleeds due to the specific staining for ferric iron and hemosiderin complexes. After deparaffinization and rehydration, the sections were stained with a commercial Prussian blue iron stain kit (Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, sections were incubated with equal parts of potassium ferrocyanide: hydrochloric acid solution for 40 minutes, rinsed in water and counterstained with Nuclear Fast Red for 5 minutes. Finally, sections were dehydrated and DPX was used as a mounting medium. The Panoramic 250 scanner (3DHitech) was used at 20x objective to digitize the histological slides and the images were captured using Case Viewer Software (3DHitech).

Statistical analysis

The SPSS 20.0 package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) were used for statistical analyses. Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method and Cox regression was used for multivariate analysis of survival. The normality was assessed by the Shapiro-Wilk test.

In normally distributed variables the significant differences between groups were assessed using Student t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post hoc test when appropriate. The effects of sex (S) and age (A) were evaluated by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test for multiple comparisons. In non-normally distributed variables, Mann-Whitney U-test was assessed for one-to-one comparisons and the Kruskal-Wallis test for multiple comparisons. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for normal distributions or as the median (interquartile range) for non-normal distributions. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Sex and genotype effect on APP23 and 5xFAD mice survival

Survival curves were plotted to determine differences in survival probability for male and female APP23, 5xFAD, and WT mice. APP23 mice were followed over their lifespan up to 24-month-old, whereas 5xFAD mice were followed up to 20-month-old due to the large drop of survival at this age (Fig.1). The lifespan measures for each mice group are summarized in Table 1. Both APP23 and 5xFAD mice showed a significant increase in genotype-dependent mortality ($p < 0.001$). Specifically, the mortality risk in male and female APP23 mice was 3.6 times and 10.1 times higher than WT sex-matched littermates, respectively. In the case of 5xFAD mice, the mortality ratio was 2.4 times and 3.1 times higher in male and female 5xFAD compared to sex-matched WT littermates (Table 2). Furthermore, although sex did not influence the overall survival in either 5xFAD or APP23 mice, the effect of genotype was significantly different depending on sex only in APP23 transgenic mice ($p < 0.001$). In this regard, the mortality risk in female APP23 mice was 2.1 times higher than in corresponding APP23 male littermates (Table 2).

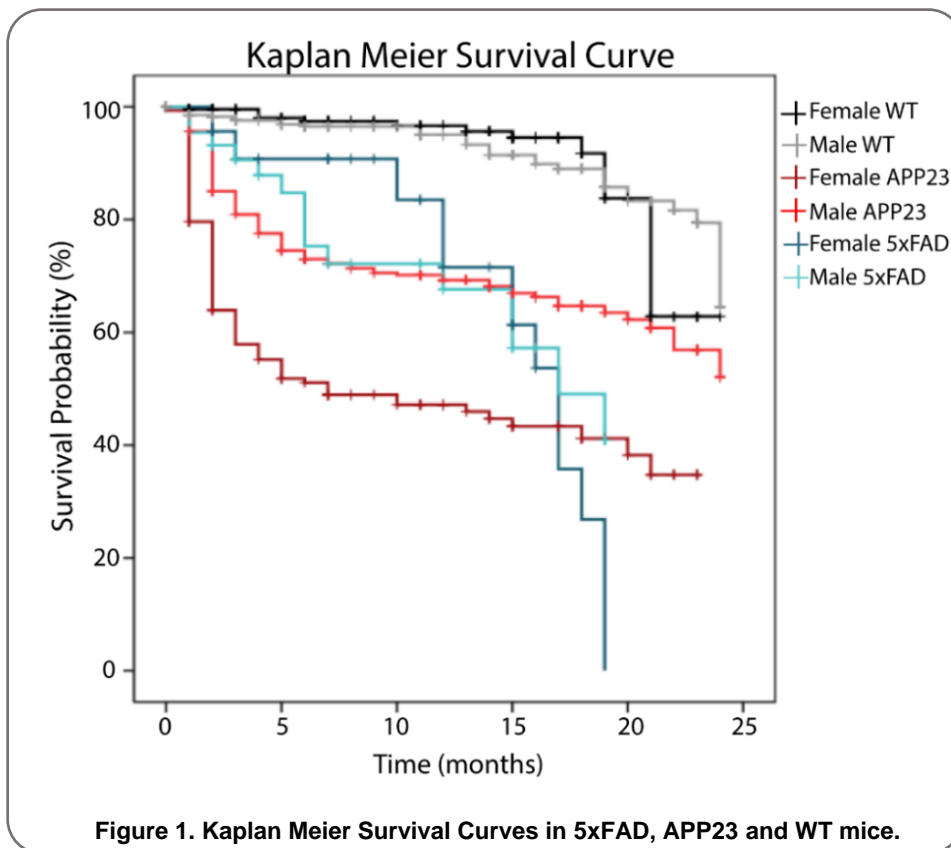


Table 1. Summary data for lifespan measures for each mouse group

	N (survival)	Mean lifespan, Months (95%CI)	Number (%) of mice dead	Number (%) of mice censored
WT				
Male	350	22.2 (21.6-22.8)	33 (9.4%)	317 (90.6%)
Female	234	22.0 (21.1-22.9)	15 (6.4%)	219 (93.6%)
APP23				
Male	275	17.1 (16.0-18.3)	95 (34.5%)	180 (65.5%)
Female	157	11.6 (10.0-13.2)	86 (54.8%)	71 (45.2%)
5xFAD				
Male	44	14.0 (11.8-16.2)	15 (34.1%)	29 (65.9%)
Female	46	14.9 (13.2-16.6)	18 (39.1%)	28 (60.9%)

Table 2. Multivariate Cox regression analysis of survival

	Hazard ratio	95%CI	p-Value
APP23 mice			
Genotype^a	3.66	2.46-5.44	<0.001
Male (APP23 vs WT)	3.66	2.46-5.44	<0.001
Female (APP23 vs WT)	10.16	5.86-17.61	<0.001
Sex^b	0.78	0.42-1.44	0.434
WT (Female vs Male)	0.99	0.53-1.86	0.995
APP23 (Female vs Male)	2.10	1.56-2.82	<0.001
5xFAD mice			
Genotype^c	2.61	1.89-3.59	<0.001
Male (5xFAD vs WT)	2.43	1.76-3.34	<0.001
Female (5xFAD vs WT)	3.17	2.17-4.62	<0.001
Sex^b	1.01	0.54-1.90	0.953
WT (Female vs Male)	0.99	0.53-1.86	0.986
5xFAD (Female vs Male)	1.20	0.60-2.40	0.599

p-Values <0.05 are shown in bold. ^a APP23 vs WT; ^b females vs males; ^c 5xFAD vs WT.

Parenchymal A β deposition

Sagittal brain sections of male and female APP23, 5xFAD and WT mice were examined in order to evaluate the differences in parenchymal amyloid deposition with age. We first confirmed the fibrillary composition of A β deposits by ThS staining (Fig. 2). As expected, A β deposition was not detected in brains from WT mice. Furthermore, while amyloid deposits were mainly observed in the cerebral cortex, hippocampus and thalamus regions in APP23 mice, A β plaques in 5xFAD mice were also detected in the midbrain, basal ganglia and hypothalamus at advanced ages, confirming the abundant amyloid pathology in this transgenic mice model (Fig. 2). Quantification of extracellular A β deposits revealed a significant age-dependent increase in both APP23 and 5xFAD mice, showing the first deposits at 4- and 12-month-old, respectively (Fig.3). Remarkably, an exacerbated A β burden was found in both male and female 5xFAD mice compared to APP23 mice in all the age groups studied. In fact, 4-month-old 5xFAD mice presented a similar number of A β deposits than 16-month-old APP23 mice, confirming, again, the massive amyloid burden in 5xFAD mice (Fig.3).

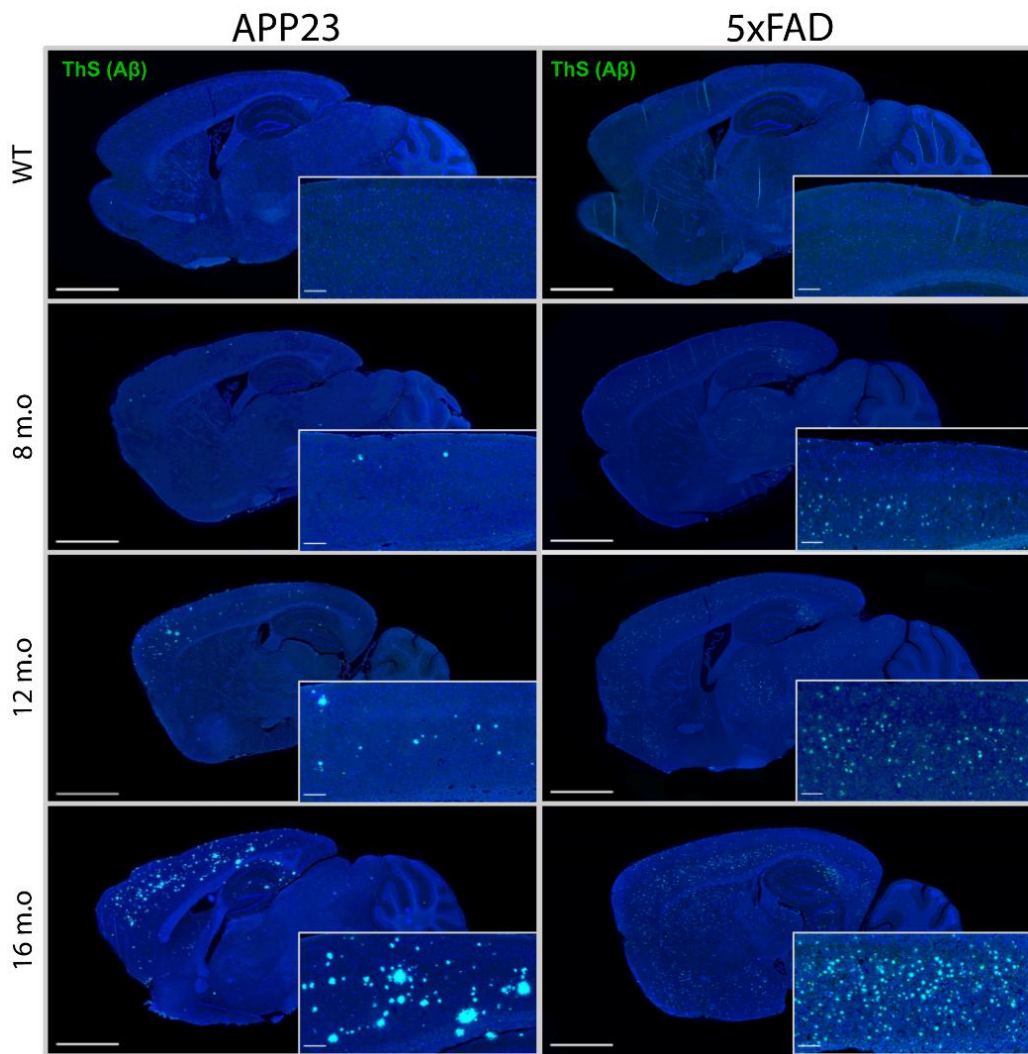


Figure 2. Extracellular A β deposition in 5xFAD and APP23 mice. Representative images of sagittal brain sections from female 5xFAD, APP23 and WT mice showing A β -positive fibrillar deposits stained with Thioflavin-S (ThS). Scale bar indicates 2 mm and 200 μ m. m.o: months old

On the other hand, the effect of sex was further evaluated in both transgenic mice models. An increased number of amyloid ThS positive deposits were found in female APP23 mice compared to males during aging (Fig. 4A). In contrast, sex differences in the number of A β deposits were only observed in young 5xFAD mice at 4- and 8-month-old (Fig. 4A). Interestingly, A β deposits in 5xFAD were smaller but more numerous than those observed in APP23 mice (Fig. 4A, 4B). However, while the size of amyloid deposits was very similar in 5xFAD mice at all ages studied, a significant increase in size with aging

was observed in APP23 mice, with a greater increase in the older females compared to age-matched males (Fig. 4B). Indeed, although the 5xFAD brains presented a higher number of deposits, the area occupied by those deposits was much smaller than in APP23 mice (Fig. 4C). Accordingly, the total area covered by ThS deposits was strongly dependent on age but also modulated by sex in APP23 mice, whereas in 5xFAD mice the main differences were attributed to age factor (Fig. 4C). Altogether, these results suggest a more prominent sex-dependent parenchymal A β pathology in APP23 than in 5xFAD mice.

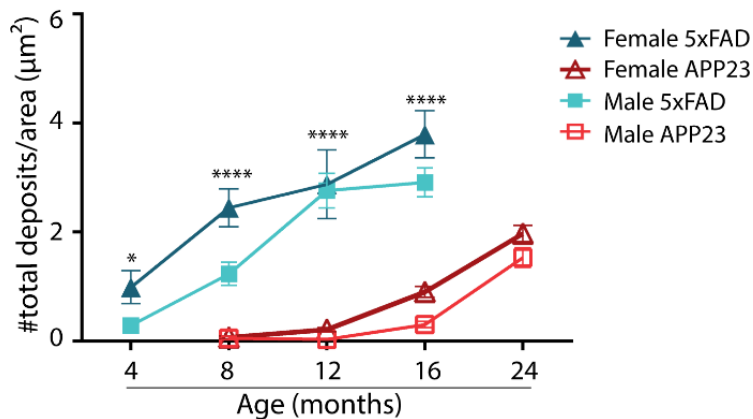


Figure 3. Age-dependent progression of extracellular A β deposits in 5xFAD and APP23 mice. Parenchymal A β burden comparison between male and female 5xFAD and APP23 mice at different ages. Data are expressed as the number of A β -positive deposits per area (pixels²). N=4-7/group. *p<0.05, ****p<0.0001

Vascular A β deposition

To assess cerebrovascular amyloid deposition in the brain of APP23, 5xFAD and WT mice, resorufin staining was performed. As shown in Figure 5A, no A β -positive vessels were detected in WT or 5xFAD at any age. As expected, leptomenigeal and cortical vessels from APP23 mice were strongly positive for resorufin staining, which specifically binds to cerebrovascular A β (Fig. 5A). Quantification of CAA burden in APP23 mice revealed an age-related increase of vascular A β deposits, detecting the first A β -positive vessels at 12-month-old (Fig. 5B). Interestingly, in contrast to parenchymal A β deposition, no differences in CAA-affected vessels were found between APP23 males and females, although a trend towards higher number of A β positive vessels was observed in 24-month-old males compared to age-matched females (Fig. 5B).

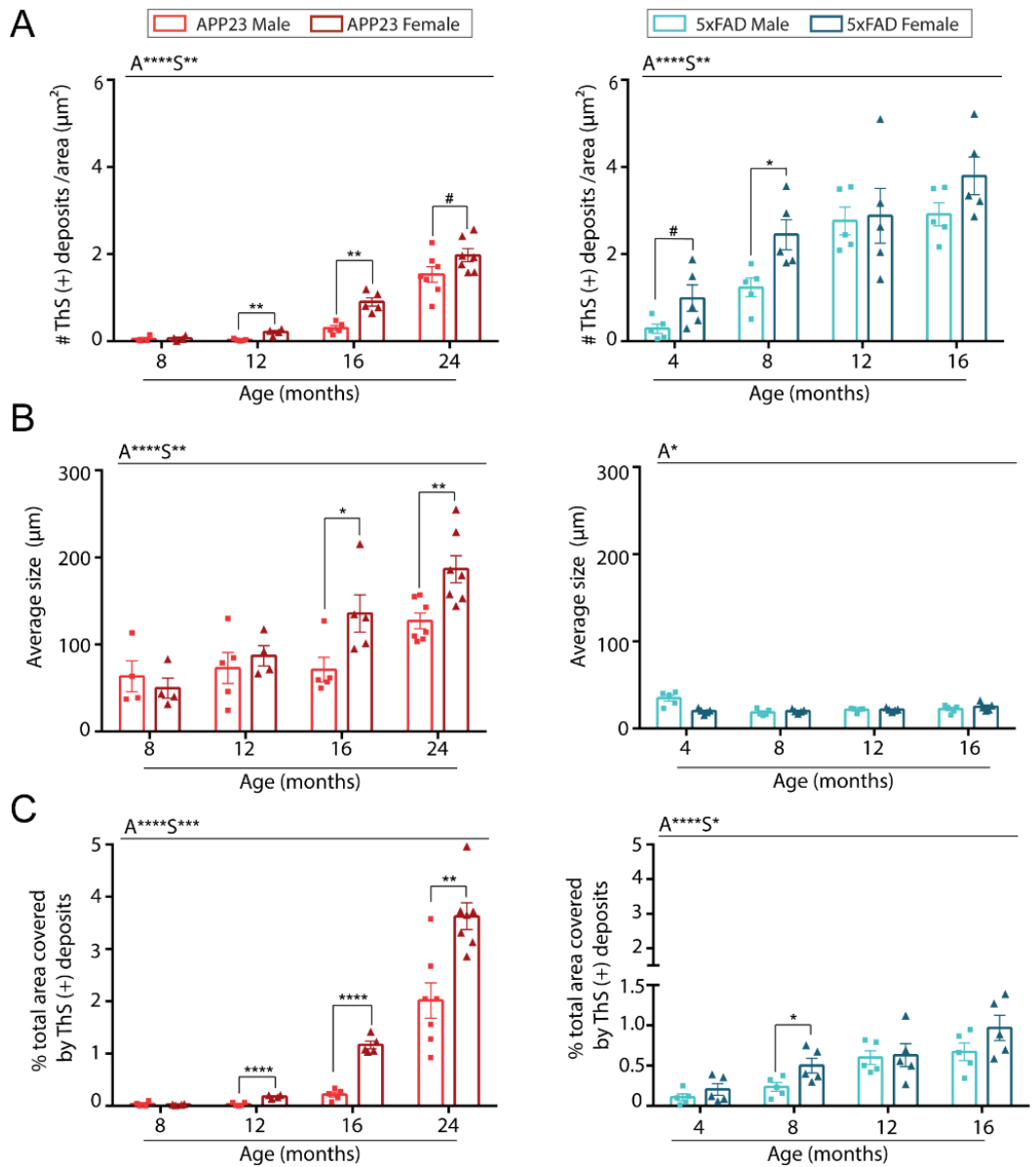


Figure 4. Quantification of parenchymal A β burden in brains from male and female 5xFAD and APP23 mice at different ages. A) Quantification of the number of ThS-positive deposits corrected by area (pixels²). B) Quantification of the average size of ThS-positive deposits (μm^2). C) Quantification of total area occupied by the deposits (%). N=4-7/group. # $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

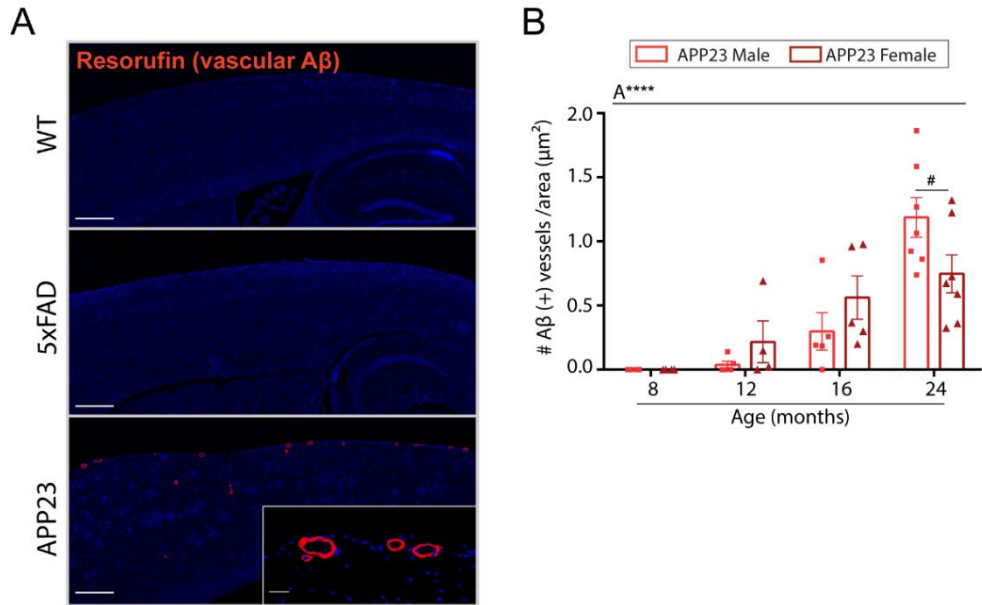


Figure 5. Vascular A β deposition in 5xFAD and APP23 mice. A) Representative images of resorufin staining in WT, 5xFAD and APP23 mice. Scale bar indicates 200 μm and 20 μm respectively. B) Quantification of the number of A β -positive vessels identified by resorufin staining in APP23 mice. Data are expressed as the number of A β -positive vessels per area (pixels²). N=4-7/group. # $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

A β 40 and A β 42 deposition

We further determined the specificity of the A β peptide present in plaques or cerebral vessels from 16-month-old-5xFAD and APP23 mice. As shown in Figure 6, the vast majority of parenchymal deposits consisted in compact amyloid, finding dense-cored plaques throughout the cortex in both transgenic models. Diffuse amyloid deposits were also observed at this age, although they were less abundant. The presence of total A β -positive leptomeningeal and cortical vessels was then confirmed by 4G8 immunostaining in APP23 mice (Fig. 6A). Remarkably, although leptomeningeal and parenchymal A β deposits were positive for both A β 42 and A β 40 antibodies, immunodetection of A β 40 was more pronounced, confirming the predominance of A β 40 pathology over A β 42 in APP23 mice (Fig. 6A2, A3). Furthermore, A β cortical vessels were robustly stained with A β 40-specific antibody in APP23 mice (Fig. 6A2), whereas no immunodetection for A β was apparent in cortical vessels or capillaries from 5xFAD mice (Fig. 6B2). However, occasional leptomeningeal vessels from aged-5xFAD mice showed some patchy and scarce A β 40 and A β 42 immunodetection (Fig. 6B3), although this staining was much less prominent than in APP23 mice (Fig. 6A3). Interestingly, some positive staining was observed in capillaries using the 4G8 and anti-A β 42 antibodies in APP23 mice, confirming that it can be used as a suitable model for the study of CAA type 1³⁶.

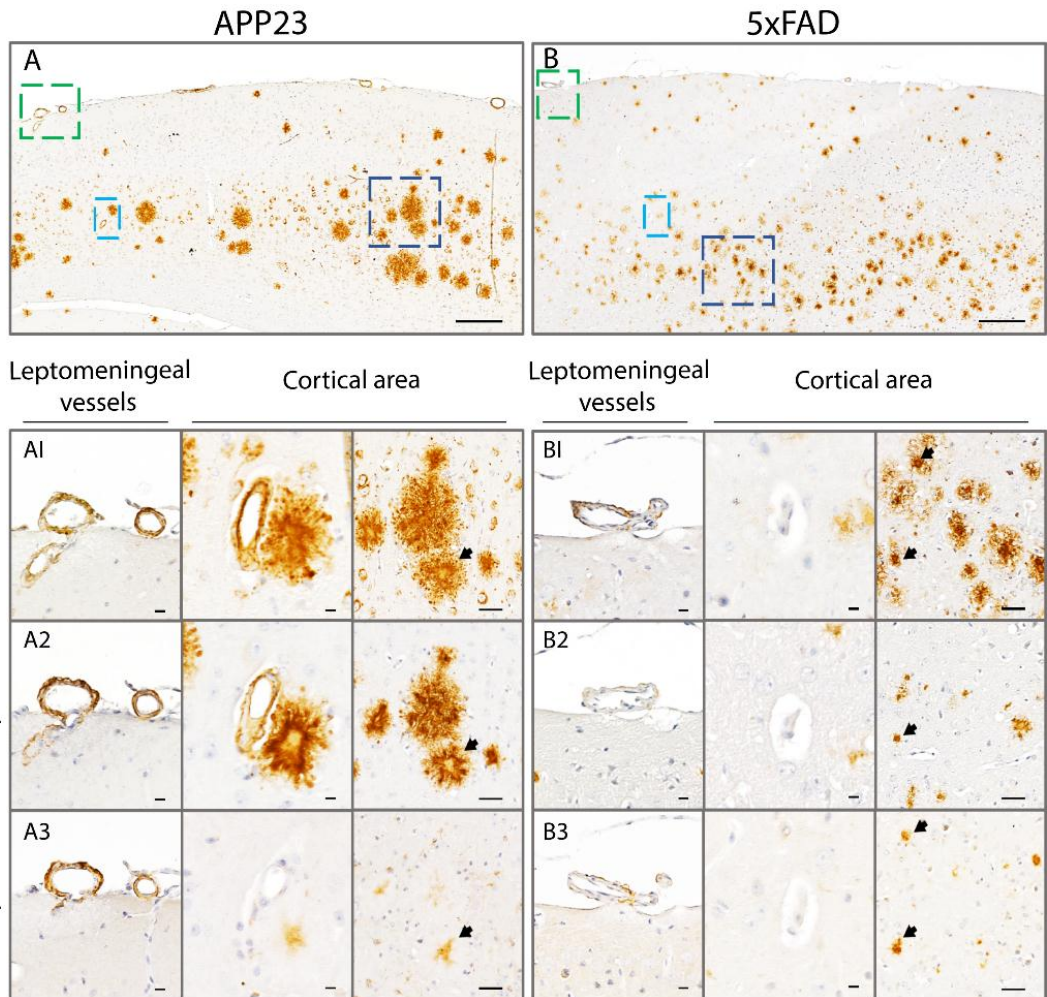


Figure 6. Specific A β 40 and A β 42 immunodetection in the parenchyma and cerebral vasculature in APP23 and 5xFAD mice. Representative images of 4G8 (1), A β 40 (2) and A β 42 (3) immunodetection in consecutive brain sections of 16-month-old female APP23 (A) and 5xFAD (B) mice. Leptomeningeal and cortical areas were evaluated in both transgenic mice. Scale bar indicates 200 μ m, 100 μ m and 40 μ m.

CAA-related cerebral microbleeds

To further evaluate the neuropathological contribution of CAA, *ex vivo* MRI was performed in 20-month-old male APP23, 5xFAD mice and WT littermates to specifically detect cerebral microbleeds. Representative T2* images of cMBs in APP23, 5xFAD and WT mice are shown in Figure 7A. Remarkably, APP23 mice displayed a substantial higher number of cMBs compared to age-matched 5xFAD mice and WT littermates (Table 3 & Fig. 7A). In this regard, the distribution of micro hemorrhages in APP23 mice

was mainly cortical, finding only 2 cMBs in deep regions among all the cMBs identified in this transgenic cohort. On the other hand, although aged-5xFAD and WT mice also presented occasional cortical cMBs, the total number did not significantly differ between them (Table 3). In particular, only one WT mice showed a single cortical cMB and 50% of the 5xFAD individuals included in the study presented 1 or 2 cMBs (Fig. 7B). In contrast, 42.8% of APP23 mice showed from 3 to 5 CMBs, whereas the other 57.2% of APP23 mice presented more than 5 cMBs (Fig. 7B). Although the size and volume of the lesions were very similar between the groups, the total hemorrhagic area was significantly different among them due to the greater number of total cMBs in APP23 mice (Table 3). Additionally, Prussian blue staining evidenced the presence of blood extravasation in APP23 mice confirming the black or hypointense lesions detected by T2*-MRI (Fig. 7C).

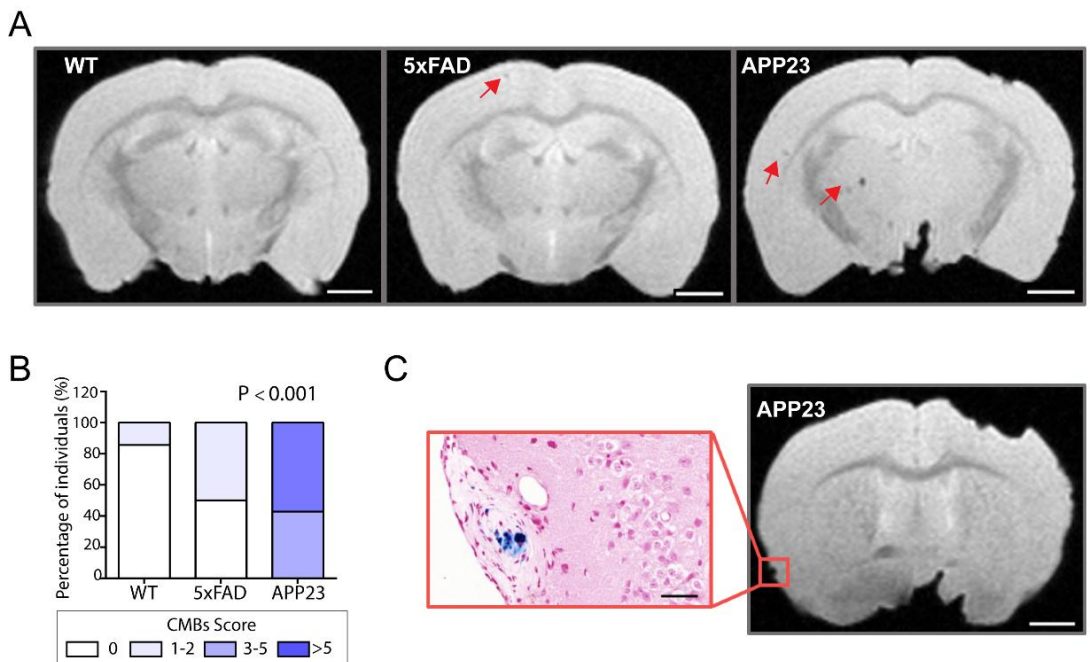


Figure 7. MRI detection of CAA-related cerebral microbleeds in 5xFAD and APP23 mice. A) Representative T2* magnetic resonance images (MRI) of cerebral microbleeds (cMBs) in 20-month-old male WT, 5xFAD and APP23 mice. CMBs are indicated with red arrows. Scale bar indicates 2 mm. B) Distribution of cMBs in WT, 5xFAD and APP23 mice, according to the percentage of individuals affected. N=4-7/group. C) Comparison of cMBs in APP23 mice T2* sequences and Prussian blue staining showing iron hemosiderin deposits. Scale bar indicates 2 mm and 40 μ m.

Table 3. Cerebral microbleeds quantification in APP23, 5xFAD and WT mice

	WT (n=7)	5xFAD (n=4)	APP23 (n=7)	p-Value
Total cMBs	0	0.50 (0-1.75) [§]	6 (4-8) ^{**}	<0.001
Size (µm)	0	195.91(48.44-249.25) ^{**}	231.09 (200.13-261.58) ^{***}	<0.001
Volume (mm³)	0	0.01 (0.002-0.015)	0.01 (0.009-0.016) ^{***}	<0.001
Hemorrhagic area (mm²)	0	1.47 (0-7.22) [§]	28.31 (14.68-79.82) ^{**}	0.006

Data are expressed as the median (interquartile range). cMBs, cerebral microbleeds. p-Values below 0.05 are shown in bold. ** p<0.01 vs. WT; *** p<0.001 vs. WT; § p<0.05 vs. APP23

DISCUSSION

The discovery of AD and CAA familial mutations in genes involved in A β processing and the identification of A β in amyloid plaques in AD patient's brains, has led to the well-known hypothesis that A β is the principal pathological feature of AD and CAA^{30,37-39}. The amyloid hypothesis proposes that these diseases are caused by an imbalance between A β production and clearance leading to parenchymal and vascular A β deposits^{40,41}. Therefore, over the last decades, the development of AD therapies has been focused on targeting the A β peptide and promoting its clearance. Nevertheless, the high failure rate of these therapies in clinical trials, and in particular, of anti-A β drugs, highlights the urgent need to develop novel disease-modifying treatments in the field of cerebral β -amyloidosis. In this context, although A β can be detected in vivo by positron emission tomography (PET) amyloid tracers, no approach so far is specific enough to provide a differential diagnosis between CAA and AD⁴², which also difficult the selection of subjects in clinical trials. Thus, animal models are an essential tool for understanding the neuropathological mechanisms underlying AD and CAA. Elucidating the impact of genetic risk factors as age or sex, and the contribution of vascular dysfunction in these experimental models could lead to the development of new specific therapies for AD and/or CAA, improve the accuracy of the current diagnosis and even facilitate the discrimination between vascular and parenchymal A β deposition in AD and CAA pathologies.

In our study, we evaluated some of the neuropathological consequences of A β deposition in the APP23 and 5xFAD transgenic mice models in terms of age and sex. APP23 mice overexpress the human APP 751 isoform harboring a single FAD mutation, the Swedish double-mutation (K670N/M671L)³³. This model was selected for its previous contribution to the study of cerebrovascular pathology associated to A β deposition^{29,43,44}. In contrast, 5xFAD mice develop early-onset parenchymal amyloid plaques and it was selected to be considered a common model for the study of AD^{45,46}. 5xFAD mice overexpress the

human APP 691 isoform with three FAD mutations (K670N/M671L, I716V, and V717I) and the human PS1 with two FAD mutations (M146L and L286V)³⁴. Although this model recapitulates the main features of amyloid AD-like pathology, no causes of human AD are explained by multiple FAD mutations. Therefore, although they have provided valuable insight into AD pathogenesis, an accurate interpretation of the results should be done before the translation to human studies.

We first explored genotype and sex differences in the lifespan of both transgenic mice. APP23 and 5xFAD mice showed a genotype-dependent increased mortality compared to WT mice, with a greater lifespan in APP23 than 5xFAD mice. In fact, whereas APP23 mice were able to reach 24-month-old lifespan, 5xFAD mice exhibited a large drop in survival from 18-month-old onwards. In this context, the early-onset amyloid pathology together with the severe functional and cognitive deficits observed in 5xFAD mice previously described⁴⁵ could explain the differences in survival between both transgenic models, presumably due to the presence of the five FAD mutations versus to the double mutation in the APP23 model. On the other hand, sex differences in mortality were only observed in APP23 mice, with females displaying higher mortality than transgenic males. Although previous studies with other AD transgenic mice such as APP/PS1 mice also pointed to longer lifespan in males⁴⁷, it is a question still controversial, as other authors reported longer lifespan in Tg2576 and 3xTg-AD females or no sex difference among APP transgenic mice^{48,49}, which make it difficult to translate this data to humans. Further studies are needed to elucidate the mechanisms underlying these sex differences in survival and to clarify whether they indicate a sex-specific AD phenotype or, contrarily, these differences are induced by specific mechanisms associated to aging or are modulated by other confounder factors.

Next, we confirmed the progressive increase of parenchymal amyloid deposits in both 5xFAD and APP23 mice with age, detecting the first neuritic plaques at 4- and 8-month-old, respectively. Consistent with previous studies, an exacerbated A β pathology was found in 5xFAD mice when compared to APP23 mice, although amyloid plaques were smaller in 5xFAD mice^{34,45}. In this regard, sex-specific differences were observed in APP23 mice in all the age-points studied, with a higher plaque pathology in females compared to males. This result is aligned with a recent study in which stronger amyloidosis and astrogliosis were reported in female APP23 mice⁵¹. Notably, whereas 5xFAD mice at advanced ages did not show sex-related differences, 4- and 8-month-old females presented increased A β deposition compared to age-matched males. Indeed, the 5xFAD original publication, in which mice were created on a B6SJL hybrid background, reported a trend towards greater plaque deposition in females³⁴, and interestingly, Bundy et al. (2019) have recently described that molecular AD pathology

was more profound in the hippocampus transcriptome of 4-month-old female 5xFAD mice compared to males⁵². In humans, it is widely known that along with age and APOE4 genotype, female sex is a major risk factor for developing human AD⁵³. In addition, neuropathological studies in AD post mortem brain tissues reported more severe AD pathology in females, with more extensive neuritic plaque deposition throughout the brain compared to men^{54,55}, confirming previous results found in pre-clinical mouse models. It is important to note that although sex steroids and hormones have been extensively proposed as key contributors to sex-related differences in AD^{53,56,57}, the potential mechanisms influencing this sex bias are not fully understood and are currently under investigation⁵⁸. It has been proposed that after menopause, the decline of estrogens was linked to AD progression⁵⁹. However, a large clinical trial in women found that estrogen-based hormone therapy was associated with increased risk rather than protection from dementia⁶⁰. Alternatively, clinical observations in men showed that age-related loss of androgens was associated with circulating and brain A β levels, suggesting that reduced androgens may contribute to AD pathology⁶¹. Indeed, *in vitro* and *in vivo* studies have also demonstrated that testosterone reduces A β deposition in AD models^{62,63}. Taken together, future research should focus on exploring the mechanism underlying sex differences to develop effective strategies for the diagnosis and treatment of AD. Our results using experimental models highlight the translational use of transgenic mice providing important evidence on sex-specific differences in AD progression as occurs in humans.

Due to the high overlap between CAA and AD and the shared role of A β in both pathologies, we further explored the amyloid deposition along the cerebral vasculature of these two transgenic mouse models. Consistently with previous studies, we confirmed the prominent vascular amyloid deposition in the APP23 model with age^{33,43,44}. Moreover, the immunostaining with A β 40 and A β 42 specific antibodies in our study corroborated the predominance of A β 40 staining. Therefore, the increased A β 40:A β 42 ratio in APP23 mice may lead to vascular amyloid deposition. In this regard, A β 42 peptide is less soluble and is more likely to be retained in the parenchyma, whereas A β 40 is more soluble and can diffuse along perivascular pathways to accumulate in the walls of vessels²⁰. It should be pointed out that, while female APP23 displayed higher parenchymal A β deposition, no apparent differences were found in CAA load between female and male mice. This result is in line with human CAA studies, in which sex differences have not been reported and sex-specific bias remains unclear^{12,13}. In this regard, we hypothesized that parenchymal A β clearance could be modulated by sex-specific mechanisms, whereas the clearance of vascular amyloid may not. However, as mentioned above, further studies are mandatory to understand the contribution of sex in A β -related pathologies.

On the other hand, no A β -positive vessels were detected in the vasculature from 16-month-old 5xFAD mice with the specific resorufin staining. Notably, although cortical vessels did not show any immunoreactivity for A β 40, some leptomeningeal arteries from aged mice were stained patchily with both A β 42 and A β 40 antibodies. In this regard, the study of the contribution of CAA pathology in 5xFAD mice has been scarce and controversial. To the best of our knowledge, there is only one study reporting CAA in leptomeningeal and penetrating vessels from 3- to 5-month-old 5xFAD mice by *in vivo* 2-photon microscopy⁶⁴. However, the number of mice included in the study was considerably small, and even more, the total volume of CAA was highly variable between them, observing no CAA in one of the five mice studied. However, other study previously reported the absence of CAA in 5xFAD mice up to 9-month-old using classical immunostaining techniques⁶⁵. This same study found higher soluble and insoluble A β 42 cerebral levels than A β 40 in this transgenic mouse⁶⁵. However, although the mutations carried by 5xFAD mice favour the production of A β 42, our immunohistochemistry results showed a moderate A β 42 and A β 40 positivity in aged-5xFAD brains. A possible explanation could be the accumulation of truncated A β species and pyroglutamate-modified A β peptides in the brains of these mice, as was previously reported by Jawhar et al⁴⁵. Nevertheless, our findings should be further explored using complementary biological methodology. In conclusion, although in both APP23 and 5xFAD mice the source of non-mutated human A β peptides produced is through neuronal expression^{33,34,36}, the generation and velocity of the peptides, defined by the mutations in the APP and/or PS1 genes, seem to determine the length and post-translational modifications of the peptides, which would influence the final localization of the A β deposition within the brain.

Finally, to assess the clinic phenotype of CAA, we evaluated the occurrence of cMBs in aged transgenic mice by MRI. In this context, it has been proposed that accumulation of A β in human cerebral vessels leads to smooth muscle degeneration, blood-brain barrier (BBB) dysfunction and eventually to vessel rupture and blood leakage, visualizing cMBs by MRI^{3,6}. CMBs in lobar location represent one of the main neuroimaging findings in CAA patients and are associated with an increased risk of ICH recurrence^{66,67}. The present study confirmed previous findings in which cMBs were detected in APP23 mice^{43,68,69}. Indeed, an age-dependent increase in the number of cMBs in APP23 mice *in vivo* from 16-month-old was previously reported, showing a size distribution comparable to our *ex vivo* data (diameter 200-300 μ m)^{43,68,69}. Although microvascular alterations can be also detected by magnetic resonance angiography in this transgenic model⁷⁰, further studies are needed to understand the mechanisms explaining BBB dysfunction and vascular leakage in APP23 mice. Altogether, we can conclude that the APP23 model constitutes an invaluable model to study the clinical consequences of CAA pathology

compared to familial CAA transgenic models in which first hemorrhages appear at very late-onset (APPDutch mice)⁷¹ or are almost absent (SwDI mice)⁷². Despite the exacerbated amyloid pathology observed in 5xFAD mice, we were only able to detect a few sporadic cMBs in 5xFAD brains. Our results did not show differences regarding the number of cMBs between 5xFAD and WT mice. Presumably, it may be due to the absence of marked CAA pathology in these mice, as we have neuropathologically demonstrated in the present study. Remarkably, 5xFAD mice harboring the human APOE alleles (E3 and/or E4) exhibited cMBS related to CAA pathology^{73,74}, potentially due to the widely known impact of the APOE gen as a risk factor for human CAA and CAA-related hemorrhage⁷⁵⁻⁷⁷. In that study, the authors suggested that cMBs precede A β plaques and might seed their formation. In contrast with their hypothesis, our results demonstrate that cMBs constitute a late event in cerebral β -amyloidosis in APP23, suggesting that they arise from the CAA-damaged vasculature.

In summary, APP23 mice presented a high risk of genotype- and sex-dependent mortality. Furthermore, an age-dependent vascular and parenchymal A β deposition was confirmed, with a greater increase in neuritic plaques presence in APP23 females. Finally, we corroborated the clinical phenotype of CAA with the presence of multiple hemorrhages by MRI. In contrast, in 5xFAD mice, the mortality risk depended only on age, and, whereas an exacerbated parenchymal A β load was observed, CAA pathology was almost absent in this model. Thus, beyond gaining insights into the mechanisms favoring parenchymal or vascular A β accumulation, APP23 transgenic model may also be useful to improve the understanding of vascular contribution in AD pathogenesis and to pre-clinically evaluate the potential therapeutic strategies in CAA.

In conclusion, we consider that the characterization of the commonly-used experimental models in the AD and CAA field is indispensable to ensure a greater translation of pre-clinical results to human clinical trials. The availability of wide variety of mice models with different phenotypes raises a good opportunity to confirm or discard pre-established hypotheses in the field of cerebral β -amyloidosis.

BIBLIOGRAPHY

1. Attems J, Jellinger K, Thal DR, Van Nostrand W. Review: Sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01137.x
2. Van Etten ES, Gurol ME, Van Der Grond J, et al. Recurrent hemorrhage risk and mortality in hereditary and sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2016. doi:10.1212/WNL.0000000000003181

3. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2017;140(7):1829-1850. doi:10.1093/brain/awx047
4. Charidimou A, Frosch MP, Salman RA-S, et al. Advancing diagnostic criteria for sporadic cerebral amyloid angiopathy: Study protocol for a multicenter MRI-pathology validation of Boston criteria v2.0. *Int J Stroke*. 2019;14(9):956-971. doi:10.1177/1747493019855888
5. Vinters H V. Cerebral amyloid angiopathy a critical review. *Stroke*. 1987. doi:10.1161/01.STR.18.2.311
6. Boulouis G, Charidimou A, Greenberg SM. Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy: Pathophysiology, Neuroimaging Features, and Clinical Implications. *Semin Neurol*. 2016. doi:10.1055/s-0036-1581993
7. Weller RO, Preston SD, Subash M, Carare RO. Cerebral amyloid angiopathy in the aetiology and immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther*. 2009;1(2):6. doi:10.1186/alzrt6
8. Keage HAD, Carare RO, Friedland RP, et al. Population studies of sporadic cerebral amyloid angiopathy and dementia: A systematic review. *BMC Neurol*. 2009;9:1-8. doi:10.1186/1471-2377-9-3
9. Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: Assessing sex and gender differences. *Clin Epidemiol*. 2014. doi:10.2147/CLEP.S37929
10. Mazure CM, Swendsen J. Sex differences in Alzheimer's disease and other dementias. *Lancet Neurol*. 2016. doi:10.1016/S1474-4422(16)00067-3
11. Mayeda ER. Invited Commentary: Examining Sex/Gender Differences in Risk of Alzheimer Disease and Related Dementias-Challenges and Future Directions. *Am J Epidemiol*. 2019. doi:10.1093/aje/kwz047
12. Allen N, Robinson AC, Snowden J, Davidson YS, Mann DMA. Patterns of cerebral amyloid angiopathy define histopathological phenotypes in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014. doi:10.1111/nan.12070
13. Jäkel L, De Kort AM, Klijn CJM, Schreuder FHBM VM. Prevalence of cerebral amyloid angiopathy: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement*. 2021:19.
14. Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. Alzheimer's Disease International. Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors. *Alzheimer's Dis Int*. 2014.
15. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018. doi:10.1111/ene.13439
16. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613
17. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011. doi:10.1186/1756-6606-4-3
18. Suzuki N, Iwatsubo T, Odaka A, Ishibashi Y, Kitada C, Ihara Y. High tissue content of soluble β 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol*. 1994.
19. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann*

- Neurol.* 2011;70(6):871-880. doi:10.1002/ana.22516
20. 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. doi:10.1038/s41582-019-0281-2
 21. Howard R, Liu KY. Questions EMERGE as Biogen claims aducanumab turnaround. *Nat Rev Neurol.* 2020. doi:10.1038/s41582-019-0295-9
 22. Sperling RA, Jack CR, Black SE, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's Dement.* 2011. doi:10.1016/j.jalz.2011.05.2351
 23. Salloway S, Sperling R, Fox NC, et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2014. doi:10.1056/nejmoa1304839
 24. 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. doi:10.3389/fneur.2015.00207
 25. Biffi A, Halpin A, Towfighi A, et al. Aspirin and recurrent intracerebral hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* 2010. doi:10.1212/WNL.0b013e3181eee40f
 26. Weber SA, Patel RK, Lutsep HL. Cerebral amyloid angiopathy: diagnosis and potential therapies. *Expert Rev Neurother.* 2018. doi:10.1080/14737175.2018.1480938
 27. Gatti L, Tinelli F, Scelzo E, et al. Understanding the pathophysiology of cerebral amyloid angiopathy. *Int J Mol Sci.* 2020. doi:10.3390/ijms21103435
 28. LaFerla FM, Green KN. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012. doi:10.1101/cshperspect.a006320
 29. Jäkel L, Van Nostrand WE, Nicoll JAR, Werring DJ, Verbeek MM. Animal models of cerebral amyloid angiopathy. *Clin Sci.* 2017. doi:10.1042/CS20170033
 30. Van Nostrand WE, Melchor JP, Romanov G, Zeigler K, Davis J. Pathogenic effects of cerebral amyloid angiopathy mutations in the amyloid β -protein precursor. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* ; 2002. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04824.x
 31. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nat Genet.* 1992. doi:10.1038/ng0692-218
 32. 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. doi:10.1002/ana.1009
 33. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. doi:10.1073/pnas.94.24.13287
 34. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal β -amyloid aggregates,

- neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
35. B.H. H, M.-L. Z, A.K. V, et al. Resorufin Analogs Preferentially Bind Cerebrovascular Amyloid: Potential Use as Imaging Ligands for Cerebral Amyloid Angiopathy. *Mol Neurodegener*. 2011.
 36. Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney AL, et al. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. doi:10.1073/pnas.96.24.14088
 37. Wattendorff AR, Frangione B, Luyendijk W, Bots GTAM. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis, Dutch type (HCHWA-D): Clinicopathological studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995. doi:10.1136/jnnp.58.6.699
 38. 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. doi:10.1002/ana.410430124
 39. Dermaut B, Kumar-Singh S, De Jonghe C, et al. Cerebral amyloid angiopathy is a pathogenic lesion in Alzheimer's disease due to a novel presenilin 1 mutation. *Brain*. 2001. doi:10.1093/brain/124.12.2383
 40. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016. doi:10.15252/emmm.201606210
 41. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science (80-)*. 2002. doi:10.1126/science.1072994
 42. Farid K, Charidimou A, Baron JC. Amyloid positron emission tomography in sporadic cerebral amyloid angiopathy: A systematic critical update. *NeuroImage Clin*. 2017. doi:10.1016/j.nicl.2017.05.002
 43. Winkler DT, Bondolfi L, Herzig MC, et al. Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neurosci*. 2001. doi:10.1523/jneurosci.21-05-01619.2001
 44. Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. ; 2000. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06915.x
 45. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027
 46. Myers A, McGonigle P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Neurosci*. 2019. doi:10.1002/cpns.81
 47. Pugh PL, Richardson JC, Bate ST, Upton N, Sunter D. Non-cognitive behaviours in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2007. doi:10.1016/j.bbr.2006.11.044
 48. Westmark CJ, Westmark PR, Malter JS. Alzheimer's disease and down syndrome rodent models exhibit audiogenic seizures. *J Alzheimer's Dis*. 2010.

- doi:10.3233/JAD-2010-100087
49. Rae EA, Brown RE. The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.09.002
 50. Kokjohn TA, Roher AE. Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: Understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimer's Dement.* 2009. doi:10.1016/j.jalz.2009.03.002
 51. Eede P, Obst J, Benke E, et al. Interleukin-12/23 deficiency differentially affects pathology in male and female Alzheimer's disease-like mice. *EMBO Rep.* 2020. doi:10.15252/embr.201948530
 52. Bundy JL, Vied C, Badger C, Nowakowski RS. Sex-biased hippocampal pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: A multi-omic analysis. *J Comp Neurol.* 2019. doi:10.1002/cne.24551
 53. Scheyer O, Rahman A, Hristov H, et al. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2018. doi:10.14283/jpad.2018.34
 54. Barnes LL, Wilson RS, Bienias JL, Schneider JA, Evans DA, Bennett DA. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Arch Gen Psychiatry.* 2005. doi:10.1001/archpsyc.62.6.685
 55. Corder EH, Ghebremedhin E, Taylor MG, Thal DR, Ohm TG, Braak H. The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: Modification by age, sex, and APOE polymorphism. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* ; 2004. doi:10.1196/annals.1297.005
 56. Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, et al. Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimer's Dement.* 2018. doi:10.1016/j.jalz.2018.04.008
 57. Medeiros ADM, Silva RH. Sex Differences in Alzheimer's Disease: Where Do We Stand? *J Alzheimer's Dis.* 2019. doi:10.3233/JAD-180213
 58. Fisher DW, Bennett DA, Dong H. Sexual dimorphism in predisposition to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2018. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.04.004
 59. Manson JAE, Aragaki AK, Rossouw JE, et al. Menopausal hormone therapy and long-term all-cause and cause-specific mortality: The Women's Health Initiative randomized trials. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017. doi:10.1001/jama.2017.11217
 60. Savolainen-Peltonen H, Rahkola-Soisalo P, Hoti F, et al. Use of postmenopausal hormone therapy and risk of Alzheimer's disease in Finland: Nationwide case-control study. *BMJ.* 2019. doi:10.1136/bmj.l665
 61. Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2009. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.015
 62. Rosario ER, Carroll J, Pike CJ. Testosterone regulation of Alzheimer-like neuropathology in male 3xTg-AD mice involves both estrogen and androgen pathways. *Brain Res.* 2010. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.068

63. Lau CF, Ho YS, Hung CHL, et al. Protective effects of testosterone on presynaptic terminals against oligomeric β -amyloid peptide in primary culture of hippocampal neurons. *Biomed Res Int*. 2014. doi:10.1155/2014/103906
64. Giannoni P, Arango-Lievano M, Neves I Das, et al. Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2016. doi:10.1016/j.nbd.2016.01.001
65. Xu F, Kotarba AME, Ou-Yang MH, et al. Early-onset formation of parenchymal plaque amyloid abrogates cerebral microvascular amyloid accumulation in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2014. doi:10.1074/jbc.M113.536565
66. Akoudad S, Ikram MA, Koudstaal PJ, et al. Cerebral microbleeds are associated with the progression of ischemic vascular lesions. *Cerebrovasc Dis*. 2014. doi:10.1159/000362590
67. Charidimou A, Imaizumi T, Moulin S, et al. Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology*. 2017. doi:10.1212/WNL.0000000000004259
68. Reuter B, Venus A, Heiler P, 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. doi:10.3389/fnagi.2016.00170
69. Beckmann N, Doelemeyer A, Zurbrugg S, et al. Longitudinal noninvasive magnetic resonance imaging of brain microhemorrhages in BACE inhibitor-treated APP transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2016. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.009
70. Beckmann N, Schuler A, Mueggler T, et al. Age-dependent cerebrovascular abnormalities and blood flow disturbances in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2003. doi:10.1523/jneurosci.23-24-08453.2003
71. Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, et al. A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci*. 2004. doi:10.1038/nn1302
72. Davis J, Xu F, Deane R, 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. *J Biol Chem*. 2004. doi:10.1074/jbc.M312946200
73. Cacciottolo M, Christensen A, Moser A, et al. The APOE4 allele shows opposite sex bias in microbleeds and Alzheimer's disease of humans and mice. *Neurobiol Aging*. 2016. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.010
74. Cacciottolo M, Morgan TE, Finch CE. Age, sex, and cerebral microbleeds in EFAD Alzheimer disease mice. *Neurobiol Aging*. 2021. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2021.02.020
75. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 1996. doi:10.1161/01.STR.27.8.1333
76. Liu Y, Yu JT, Wang HF, et al. APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015. doi:10.1136/jnnp-2014-307719

77. Biffi A, Sonni A, Anderson CD, et al. Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*. 2010. doi:10.1002/ana.22134

**Lactadherin (MFG-E8): A Novel Marker Associated with Cerebral
Amyloid Angiopathy**

LACTADHERIN (MFG-E8): A NOVEL MARKER ASSOCIATED WITH CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY

Paula Marazuela¹, Montse Solé¹, Anna Bonaterra-Pastra¹, Jesús Pizarro¹, Jessica Camacho², Elena Martínez-Sáez², H. Bea Kuiperij³, Marcel M.Verbeek^{3,4}, A. Kort³, F. Schreuder³, K. Klijn³, Laura Castillo-Ribelles⁵, Olalla Pancorbo⁶, David Rodríguez-Luna⁶, Francesc Pujadas⁷, Pilar Delgado¹, Mar Hernández-Guillamon^{1,*}

¹ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ² Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³ Department of Neurology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud Alzheimer Centre, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ⁴ Department of Laboratory Medicine, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ⁵ Clinical Biochemistry Department, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶ Stroke Unit, Department of Neurology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; ⁷ Dementia Unit, Neurology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

* Corresponding author: mar.hernandez.guillamon@vhir.org

ABSTRACT

Brain accumulation of amyloid-beta (A β) is a crucial feature in Alzheimer's disease (AD) and cerebral amyloid angiopathy (CAA), although the pathophysiological relationship between these diseases remains unclear. Numerous proteins are associated with A β deposited in parenchymal plaques and/or cerebral vessels. We hypothesized that the study of these proteins would allow understanding the overlap and biological differences between these two pathologies and to propose new diagnostic tools and specific treatment targets. We used a laser capture microdissection approach combined with mass spectrometry in the APP23 transgenic mouse model of cerebral- β -amyloidosis to specifically identify vascular A β -associated proteins. We focused on one of the main proteins detected in the A β -affected cerebrovasculature: MFG-E8 (milk fat globule-EGF factor 8), also known as lactadherin. We first validated the presence of MFG-E8 in mouse and human brains. Immunofluorescence and immunoblotting studies revealed that MFG-E8 brain levels were higher in APP23 mice than in WT mice. Furthermore, MFG-E8 was strongly detected in A β -positive vessels in human *postmortem* CAA brains, whereas MFG-E8 was not present in parenchymal A β deposits. Levels of MFG-E8 were additionally analysed in serum and cerebrospinal fluid (CSF) from patients diagnosed with CAA, patients with AD and control subjects. Whereas no differences were found in MFG-E8 serum levels between the groups, the MFG-E8 concentration was significantly lower in the CSF of CAA patients compared to controls and AD patients. Finally, in human vascular smooth muscle cells MFG-E8 was protective against the toxic effects of treatment with the A β 40 peptide with the Dutch mutation. In summary, our study shows that MFG-E8 is highly associated with CAA pathology and highlights MFG-E8 as a new CSF biomarker that could potentially be used to differentiate cerebrovascular A β pathology from parenchymal A β deposition.

Keywords: Cerebral amyloid angiopathy, Alzheimer's disease, amyloid-beta, laser capture microdissection, MFG-E8, biomarkers, cerebrospinal fluid, vascular smooth muscle cells.

INTRODUCTION

Cerebral β -amyloidosis is characterized by the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) protein in the brain parenchyma and cerebral blood vessels, which are major features of Alzheimer's disease (AD) and $A\beta$ -associated cerebral amyloid angiopathy (CAA), respectively^{1,2}. AD is the main cause of dementia³, whereas CAA is the most common cause of lobar intracerebral haemorrhage (ICH) in elderly individuals^{4,5}. The principal neuropathological hallmarks of AD are the extracellular deposition of $A\beta$ in neuritic plaques and the intracellular generation of neurofibrillary tangles (consisting of hyperphosphorylated tau protein)⁶. On the other hand, CAA predominantly affects leptomeningeal and cortical arteries and arterioles in lobar areas, although capillaries are also frequently involved⁷. Population-based autopsy studies have estimated a CAA prevalence of 20-40% in non-demented individuals and 50-60% in those with dementia, which demonstrates its strong association with AD⁸. In fact, the prevalence of CAA pathology is particularly high in patients with AD, accounting for 47-100% of those patients⁸.

Even though there is a large degree of overlap between the two pathologies, they are clinically distinct; whereas AD promotes neuronal loss and dementia, CAA leads to vascular dysfunction, lobar haemorrhage⁹, and cognitive decline independent of AD¹⁰. Moreover, although $A\beta$ accumulates in both pathologies, the mechanisms explaining the different localization of the deposits in the brain have not been fully elucidated. Some factors seem to favor vascular or parenchymal $A\beta$ deposition, such as the length of $A\beta$ peptides; $A\beta_{40}$ is predominantly found in CAA-affected vessels, whereas $A\beta_{42}$ is the main component of neuritic plaques in AD^{11,12}. In addition, mutations in the *APP* gene (β -amyloid precursor protein) can also predispose the formation and deposition of $A\beta$ towards a vascular or a parenchymal location¹³. For instance, the E693Q mutation in *APP* causes the autosomal dominant disorder Dutch-type hereditary CAA (also known as hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis, Dutch type, HCHWA-D), which is characterized by severe $A\beta$ deposition in cerebral and cortical arterioles with much less deposition in the brain parenchyma^{9,14}. On the other hand, a number of $A\beta$ -associated proteins have been identified both in neuritic plaques and CAA, such as complement proteins, serum amyloid-P component, glycosaminoglycans, and apolipoprotein E (ApoE) or apolipoprotein J (ApoJ)¹³. Recently, via proteomic analysis, the presence of ApoE or ApoJ was confirmed in leptomeningeal and cortical vessels from CAA patient brains¹⁵⁻¹⁷. In these studies, other proteins were identified being specifically associated with vascular deposits and absent from neuritic plaques, such as tissue inhibitor of

metalloproteinases-3 (TIMP3)¹⁵, norrin (NDP), collagen- α -2(VI) (COL6A2)¹⁶, or sushi repeat-containing protein-1 (SRPX1)¹⁸. Whereas such a proteomic strategy has been widely used in AD models^{19,20}, the identification of biomarkers related to vascular A β accumulation and their potential implications in the pathology have been less explored. Finding novel amyloid-associated proteins exclusively present in brain vessels is still a challenge and may be a valid approach to find novel biomarkers for CAA and provide new insights into the mechanisms of CAA formation. For this purpose, we used a laser capture microdissection approach combined with proteomics to selectively isolate vascular or parenchymal A β deposits from a transgenic mouse model of cerebral β -amyloidosis. We focused our study on milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8), as it was one of the proteins specifically co-detected with A β -affected cerebral vessels and absent from neuritic plaques in the APP23 mouse model of AD/CAA. MFG-E8, also known as lactadherin, is a secreted glycoprotein originally identified as a component of milk fat globules²¹. MFG-E8 has been reported to be involved in several physiological and pathophysiological processes, including immunity²², angiogenesis^{23,24}, and the clearance of apoptotic cells^{25,26} and platelet-derived microvesicles from the circulation^{27,28}. Moreover, MFG-E8 plays an important role in A β 42 phagocytosis in vitro^{29,30}, although its contributions to vascular dysfunction in AD and CAA still need to be established.

The first aim of this study was to validate the expression and localization of MFG-E8 protein in the APP23 transgenic model. We next explored the cerebral distribution of MFG-E8 in human *postmortem* cortical sections from CAA patients, where its association with vascular and parenchymal A β deposition was examined. Furthermore, circulating MFG-E8 levels were analysed in serum and cerebrospinal fluid (CSF) from CAA patients, AD patients and healthy controls. Finally, the contribution of MFG-E8 to A β -induced cytotoxicity in cultured human vascular smooth muscle cells was also investigated.

MATERIAL AND METHODS

APP23 transgenic mice model

Mice were maintained on a 12-hour/12-hour light-dark cycle in a temperature-controlled room with food and water available *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Vall d'Hebron Research Institute (78/13 CEEA) and were performed following Spanish legislation and in accordance with the Directives of the European Union. All experiments were carried out on APP23 transgenic mice (hemizygote B6, D2-TgN [Thy-APPSWE]-23-Tg mice, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)³¹. These transgenic mice overexpress the human-type APP protein with the Swedish mutation (K670M/N671L) under the control of the murine brain and neuron-specific Thy-1 promoter (thymocyte antigen-1). Hemizygous

APP23 mice were backcrossed with C57BL/6 mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), and the APP genotype was tested by Transnetyx (Cordova, TN, USA). Wild-type (WT) and APP23 mice were aged in the Vall d'Hebron Research Institute animal facility to obtain the final study cohort. The number of mice per group is specified in each figure.

Brain tissue preparation and laser capture microdissection

Paraffin-embedded brain tissue from 24-month-old APP23 and WT mice (n=3/ group) was cut into 10 µm-thick sections and mounted onto ultraviolet-irradiated 2 µm polyethylene naphthalate (PEN) membrane slides (MicroDissect GmbH, Herborn, Germany). Between 10 and 20 brain sections from each mouse were used to isolate an approximate total area of 10⁶ µm². An equivalent area of PEN membrane slices without brain tissue was also microdissected as a negative control. Before microdissection, the sections were deparaffinized for 1 hour at 65°C, rehydrated with graded ethanol solutions, and then stained with Thioflavin-S (ThS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) or tomato lectin (TL) (*Lycopersicon esculentum lectin*; Burlingame, Vector Labs, CA, USA) solutions. ThS staining was performed to detect fibrillary Aβ (cerebral CAA vessels and parenchymal Aβ plaques) in APP23 mice. Briefly, sections were incubated in ThS (1% in 75% ethanol) for 30 seconds. The excess ThS was removed, and the sections were immersed a second time in ThS (0.1% in 75% ethanol) for another minute. After washing with 75% ethanol, the samples were dehydrated and air-dried. In parallel, sections from 24-month-old WT mice were stained with TL to label all cerebral blood vessels and to be used as control material. The sections were rinsed twice in PBS-1% Tween 20 (PBST) for 5 minutes and then incubated with DyLight 594-labelled TL diluted 1:100 for 1 hour at room temperature (RT). The sections were finally washed with PBST, dehydrated, and air-dried. Laser capture microdissection (LCM) was performed using the 20x objective of an LMD600 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). ThS-positive vessels or parenchymal plaques from APP23 mice and TL-positive cerebral vessels from WT mice were independently collected into the caps of 0.5 ml microcentrifuge tubes containing 20 µl of 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 10 mM Tris (Sigma-Aldrich), 0.002% Zwitterionic detergent (Sigma-Aldrich) and ¼ Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). The collected samples were frozen at -80°C until analysed.

Liquid chromatography-mass spectrometry analysis and protein identification

Collected tissues were heated at 98°C for 90 minutes and then sonicated for 60 minutes in a water bath refrigerated with ice. The samples were then digested with trypsin and subsequently analysed using a linear ion trap Velos-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher, Bremen, Germany) by the Proteomics Unit of the Vall d'Hebron Institute

of Oncology (VHIO, Barcelona, Spain). The peptide mixtures were fractionated by on-line nanoflow liquid chromatography using an EASY-nLC system (Proxeon Biosystems, Thermo Fisher) with a two-linear-column system. The LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer was operated in the range of m/z 300 to 1600 with a resolution of 30,000. The 20 most abundant ions were selected for fragmentation by collision-induced dissociation with an isolation window of 2 Da.

Proteins were identified using a MASCOT search (Matrix Science, London, UK) against the SwissProt database (version 2016_0108) taxonomy selected for *Mus musculus* (16754 entries) or *Homo sapiens* (20194 entries). MS/MS spectra were searched with a precursor mass tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.5 Da, and trypsin specificity with a maximum of two missed cleavages. The label-free approach was used for evaluation based on the total number of spectra identified for a single protein, known as the spectral count. All proteins were sorted in descending order regarding the spectral count. The proteins identified in each group were considered present when they were detected in all three samples of each group with a spectral count ≥ 1 . Shared proteins between experimental groups are also reported. All proteins identified for each experimental group are reported in Suppl. Data 1-7. The coverage of the murine MFG-E8 sequence and the peptides detected by mass spectrometry are shown in Suppl. Fig. 1.

Mouse brain homogenates

The soluble protein fraction was obtained from each hemisphere of the mouse brain. Brain tissue was homogenized with a Dounce homogenizer in 4 ml of Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche). Each homogenate was then centrifuged at 8,000 $\times g$ for 30 minutes at 4°C. The supernatant was selected as the soluble protein fraction, whereas the resulting pellet was further homogenized to obtain other protein fractions for other experiments. The collected fractions were frozen at -80°C until use. The protein concentration of each fraction was quantified with a BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher) and was used for the validation of MFG-E8 in brains from WT and APP23 mice by western blot analysis.

Immunofluorescence in mouse brain sections

Immunofluorescence validation of MFG-E8 was performed in paraffin-embedded brain sections from 24-month-old APP23 and WT mice ($n=3$ /group). All samples were deparaffinized, hydrated, and treated with 70% formic acid for antigen retrieval for 30 minutes. The samples were blocked in 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) in PBST for 1 hour at RT and then incubated overnight (ON) with goat anti-MFG-E8 (1:50, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). After rinsing, the samples were incubated with the secondary antibody anti-goat-Alexa Fluor-488 (Thermo Fisher) diluted 1:500 in

blocking solution for 1 hour at RT. Finally, the samples were dehydrated, and DAPI was used for contrast staining before mounting the slices. MFG-E8-positive vessels were manually counted in each brain region under an Olympus BX61 microscope using a 10x objective. Double immunofluorescence was performed for MFG-E8 and A β using the same approach as previously described. A mouse anti-A β monoclonal antibody (4G8, 1:1000, BioLegend, San Diego, CA, USA) was used as the primary antibody, and anti-mouse Alexa Fluor-568 (1:500, Thermo Fisher) was used as the secondary antibody. Double immunofluorescence images were captured with an Olympus FV1000 confocal microscope.

Immunohistochemistry in human brain tissue

Postmortem brain tissue was obtained from the Neurological Tissue Bank of the Vall d'Hebron University Hospital (VHUH). Patients included in this study, or their relatives, expressed their willingness to donate brain tissue for research purposes. The project was approved by the Clinical Investigation Ethical Committee of the Vall d'Hebron University Hospital, PR(IR)173/2019. All samples were obtained from 2 to 20 hours after death, and specimens were fixed in 10% buffered formalin for 3–4 weeks. All patients included in the study had a complete autopsy that included a neuropathological examination performed in the Pathology Department of the HUVH. Briefly, CAA lesions were graded following the criteria described by Greenberg and Vonsattel³², the classification into CAA type I and CAA type II was made according to the criteria described by Thal et al.³³. Alzheimer's disease pathology was evaluated and staged according to the NIA-AA criteria (ABC score)³⁴, combining Thal A β phases³³, Braak (neurofibrillary tangle scores)³⁵ and CERAD's criteria (neuritic plaque scores)³⁶.

The presence of A β and MFG-E8 immunostaining was evaluated in consecutive sections of previously selected paraffin blocks. Paraffin-embedded cortical brain sections were deparaffinized, hydrated, and incubated with citrate buffer to improve antigen exposure (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH=6) for 30 minutes at 95°C. The sections were then blocked in 10% goat serum in PBST for 1 hour at RT and incubated ON with the anti-A β monoclonal antibody 4G8 (1:5000, BioLegend) or an anti-MFG-E8 polyclonal antibody (1:1000, Thermo Fisher). The slices were then treated with 3% hydrogen peroxide for 15 minutes to block endogenous peroxidases. Afterward, the slices were incubated with biotinylated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG (1:1000, Vector Labs) for 1 hour at RT and then with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP; 1:1000, Vector Labs). Finally, diaminobenzidine (DAB; Dako, Denmark) was applied to the samples, and the sections were immersed in Harris haematoxylin solution (Sigma-Aldrich) for contrast staining. The samples were dehydrated, and DPX (Sigma-Aldrich) was used as a mounting medium. A Panoramic 250 scanner (3DHitech, Budapest, Hungary) was

used with a 20x objective to digitize the histological slides, and images were captured using Case Viewer Software (3DHistech). The immunodetection of A β and MFG-E8 in parenchymal plaques and cortical vessels was evaluated qualitatively according to the total number of deposits in an equivalent area of 385-400 mm² in all the slides and was classified as follows: a score of 0 was assigned when no signal was detected (absence of deposits), a score of 1 was assigned for mild detection (1-50 deposits), a score of 2 was assigned for moderate detection (51-100 deposits), and a score of 3 was assigned for intense detection (>100 deposits). The evaluation of the slides and the determination of the score were conducted by two investigators blinded to the group distribution.

Serum MFG-E8 determination

MFG-E8 levels were quantitatively determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serum samples from CAA-associated ICH patients (n=31), AD patients (n=25), and age- and sex-matched controls (n=39). All of them were recruited at the Vall d'Hebron University Hospital (VHUH), Barcelona, Spain. The study was approved by the Clinical Investigation Ethical Committee of the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain (PR(AG)326/2014) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients provided signed informed consent before inclusion. Serum samples from CAA patients were collected in the non-acute phase (at least two months after the last ICH) to avoid the initial inflammatory process. The CAA-ICH patients were >55 years old and had suffered lobar ICH with clinical suspicion of possible/probable CAA diagnosed by magnetic resonance imaging (MRI) following the modified Boston criteria³⁷. The recruited AD patients presented sporadic probable Alzheimer's disease according to the NIA-AA criteria³⁸. The AD patients did not present a history of stroke before recruitment. The control subjects were healthy family members or companions of the patients with no history of stroke or dementia. Peripheral blood was collected in EDTA tubes, and serum was immediately separated by centrifugation and stored at -80°C. The final results were analysed following the manufacturer's instructions (R&D Systems, #DFGE80) in a Synergy™ Mx Microplate reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Each serum sample (5-fold dilution) was assayed in duplicate.

Cerebrospinal fluid MFG-E8 determination

MFG-E8 levels in cerebrospinal fluid (CSF) were measured in two independent clinical patient cohorts. AD patients (n=26) and age- and sex-matched controls (n=10) were recruited from the VHUH (Barcelona, Spain). CAA patients (n=23) and corresponding controls (n=27) were recruited from the Radboud University Medical Center (Nijmegen, The Netherlands). The use of CSF samples from patients and controls from both cohorts (VHUV and Radboud UMC) was approved by the local medical ethical committees and informed consent was obtained from all study subjects or their legal representatives. CAA

patients were diagnosed on the basis of the modified Boston Criteria, and were classified as either probable CAA (n=18), CAA presenting with mixed-location cerebral hemorrhages (lobar and deep hemorrhages/microbleeds, n=4)³⁷, or as confirmed suffering from a hereditary form of CAA, Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis-Dutch type patients (n=1). The recruited AD patients presented sporadic probable Alzheimer's disease according to the NIA-AA criteria³⁸. Control subjects underwent a lumbar puncture as part of the diagnostic workup of neurologic symptoms or to exclude central nervous system involvement of a systemic disease. They neither had the suspected neurological disease nor a neurodegenerative disease, known cognitive impairment, sepsis, stroke, nor a malignancy in the central nervous system (CNS). Additional inclusion criteria were the availability of a sufficient amount of available CSF and a normal composition of the CSF for a number of routine parameters. The levels of t-tau, p-tau and A β 2 in the CSF of controls and patients were previously provided. CSF A β 0 concentrations were only available from Radboud UMC patients and controls. The CSF biomarker profile and demographic characteristics for both control cohorts are described in Suppl. Table 5.

All CSF samples were obtained by lumbar puncture via standard procedures, collected in polypropylene tubes, centrifuged, and stored at -80°C. Finally, the CSF MFG-E8 levels were determined with a commercial ELISA kit (R&D Systems, #DFGE80) in 10-fold diluted samples that were tested and analysed in a blind manner to the diagnostic group.

Cell culture and treatments

Primary cultures of human brain vascular smooth muscle cells (HBVSMCs) were obtained from Innoprot (Derio, Bizkaia, Spain). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco, MD, USA), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin and maintained at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂. For treatments, cells were seeded on poly-L-lysine-coated 24- and 48-well cell culture plates at densities of 30,000 and 15,000 cells/ml, respectively. The HBVSMCs were grown in DMEM complete serum medium for 48 hours and starved in FBS-free medium for the treatments. A β (1-40) and A β (1-40) containing the Dutch mutation (A β 40-D; AnaSpec, San Jose, CA, USA) were dissolved in hexa-fluoro-2-isopropanol (Sigma-Aldrich) for 6 hours and divided into 250 μ g aliquots. The organic solvent was evaporated overnight, and aliquots were stored at -80°C until use. To mimic the effect of A β in the cerebral vasculature, HBVSMCs were treated for 2 or 5 days with 25 μ M A β (1-40) or 25 μ M A β 40-D previously dissolved in sterile water. Recombinant human MFG-E8 protein (rhMFG-E8; R&D Systems) was added at 2 μ g/ml for 5 days.

MFG-E8 knockdown by siRNA

Cells were seeded on poly-L-lysine-coated 48-well cell culture plates at a density of 15,000 cells/ml and were grown with DMEM complete serum medium for 48 hours. A commercial Accell SMART pool of 4 short interfering RNAs (siRNAs, GE Dharmacon, Lafayette, CO, USA) was used to achieve MFG-E8 gene silencing. An Accell non-targeting siRNA pool (GE Dharmacon) was used as a negative control. The siRNAs were initially resuspended at 100 μ M according to the manufacturer's instructions. Cells were treated with 1 μ M MFG-E8 siRNA or non-targeting siRNA. Forty-eight hours after transfection, fresh FBS-free medium was added, and the cells were then treated with 25 μ M A β 40-D for 2 days.

Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from HBVSMCs using a SpeedTools Kit (Biotools, Madrid, Spain), and cDNAs were synthesized through reverse transcription using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The mRNA levels were quantified using TaqMan probes for MFG-E8 (Hs00983890_m1, Thermo Fisher) and PPIA (peptidylprolyl isomerase A, Hs99999904_m1, Thermo Fisher). Quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) was performed in triplicate using an Applied Biosystems Prism 7900HT Fast System. Gene expression was normalized to PPIA levels, and relative quantification values were calculated using the Livak equation ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Cell viability and total cell lysate preparation

The cytotoxicity in HBVSMCs was estimated by the mitochondrial-dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) to purple formazan. Briefly, after treatments, cells were incubated with 0.5 mg/ml MTT solution for 90 minutes at 37°C. The medium was replaced with dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), and the amount of formazan crystals formed was spectrophotometrically quantified at 560 nm and 620 nm using a Synergy™ Mx Microplate reader (BioTek Instruments Inc.). Cell viability is expressed as a percentage of the control condition for each independent experiment. Total cell lysates for western blot analysis were obtained by cell homogenization in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, and protease inhibitors (protease inhibitor cocktail; Sigma-Aldrich). The lysates were sonicated for 10 seconds and stored at -80°C until use.

Immunocytochemistry

HBVSMCs were grown on poly-L-lysine-coated glass coverslips at a density of 15,000 cells/ml for 2 days. The cells were fixed for 15 minutes with 4% paraformaldehyde and blocked with 3% BSA in PBST for 1 hour at RT. The slices were then incubated overnight

with the following primary antibodies diluted in blocking solution: rabbit anti-MFG-E8 (1:50, Thermo Fisher) and mouse anti-smooth muscle actin (1:100, SMA; Abcam, Cambridge, UK). After rinsing, the cells were incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 568 or Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher) at a 1:500 dilution for 1 hour at RT. Coverslips were finally mounted onto the glass slides using DAPI for contrast staining. Images were acquired using a Zeiss LSM 980 confocal laser microscope.

Western blot

Total cell lysates were obtained with freshly prepared ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% BRIJ-35, 0.02% NaN₃, 1% Triton X-100, 1% phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich), and 0.5% aprotinin (Sigma-Aldrich). The protein concentrations were determined using a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Equal amounts of protein from mouse membrane-bound brain fractions (50 µg) or cell lysates (10 µg) were analysed by 10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane using a Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked for 1 hour with 10% non-fat milk in PBST, and the membranes were then incubated with specific primary antibodies at 4°C ON. After rinsing, the membranes were incubated with HRP-labelled secondary antibodies for 1 hour at RT. Finally, the protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence using Pierce® ECL Western Blotting Luminol (Thermo Fisher). ImageJ software was used to quantify the intensity of specific bands. All protein measurements were divided by β-actin measurements for normalization. The primary antibodies used were goat anti-MFG-E8 (1:1000, R&D), rabbit anti-hMFG-E8 (1:1000, Thermo Fisher), and mouse anti-β-actin (1:10000, Sigma-Aldrich). The following HRP-labelled secondary antibodies were used: anti-rabbit-HRP (1:2000, GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont, UK), anti-mouse-HRP (1:2000, GE Healthcare Bioscience), and anti-goat-HRP (1:5000, GE Healthcare Bioscience).

Statistical analyses

The SPSS 20.0 package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) were used for statistical analysis. For experimental results, the Shapiro-Wilk test was used to analyse the normality of continuous variables. In animal experiments, significant differences between groups were determined by Student's t-test. The effects of genotype (G) and age (A) were evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post hoc test. In human cell culture experiments, differences between groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparisons. In studies based on human samples, descriptive statistics were used to define demographic data and clinical

characteristics for the diagnostic groups (CAA patients and/or AD patients and controls). Contingency tables were constructed and chi-squared tests were conducted for categorical variables. The distributions of continuous variables were tested using the Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov test, as appropriate. For normally distributed variables, one-way ANOVA with Tukey's post hoc test was performed. For non-normally distributed variables, the Mann-Whitney U-test was used for one-to-one comparisons, and the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test was used for multiple comparisons. Associations between two continuous variables were calculated with Spearman's rho. The data are expressed as the mean \pm SEM for normal distributions or as the median (interquartile range) for non-normal distributions. A p -value <0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

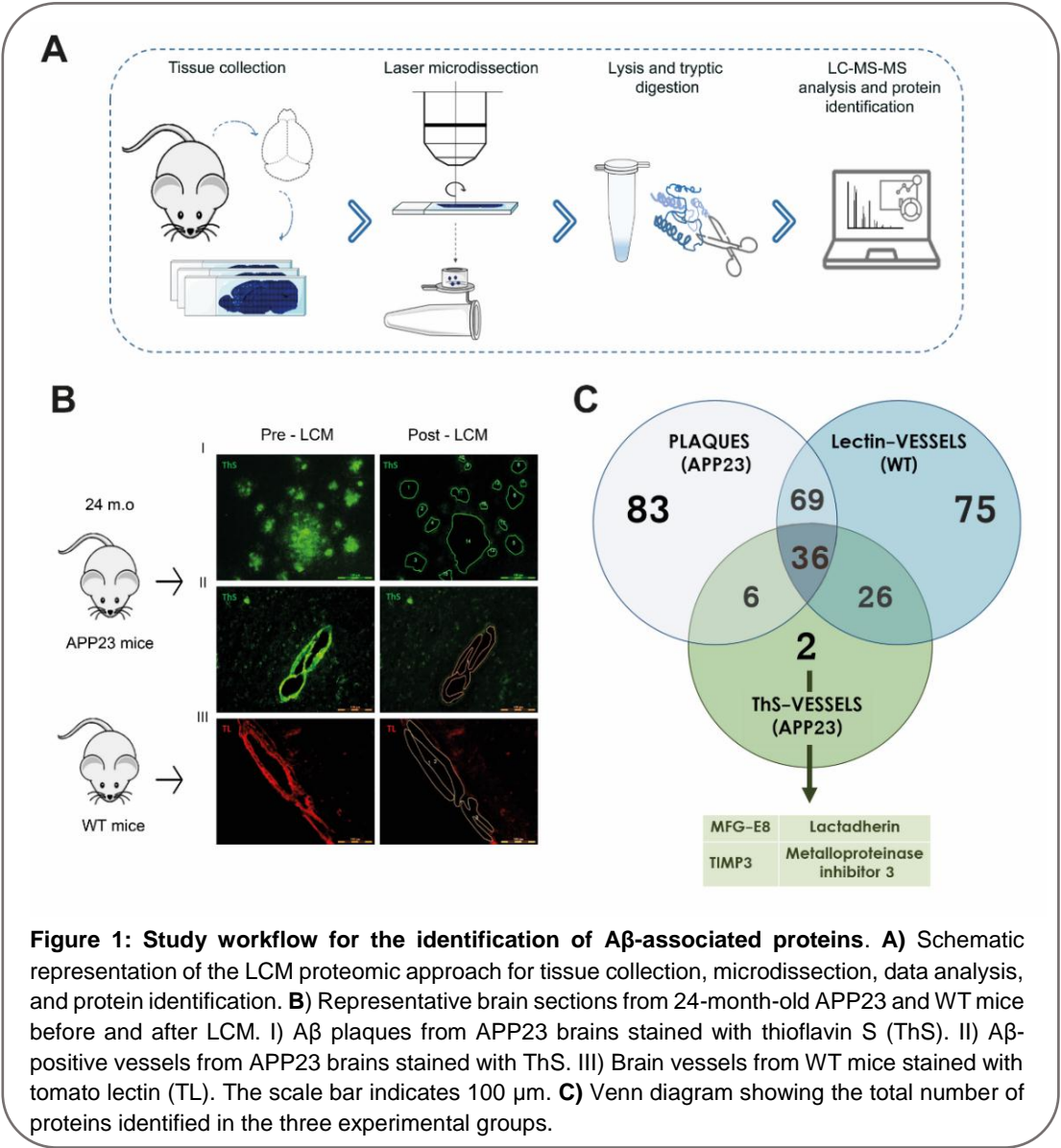
Protein identification in the A β -affected cerebral vasculature

To identify proteins that specifically co-deposited with A β in the cerebrovasculature, we used LCM followed by mass spectrometry in consecutive paraffin-embedded brain sections from 24-month-old APP23 and WT transgenic mice (Fig. 1A). Neuritic plaques and A β -positive vessels were detected using ThS staining in APP23 brains and were independently microdissected, as shown in Figure 1B. Cerebral blood vessels from WT mice were visualized using TL staining and were selected as control material for LCM isolation (Fig. 1B, III). The proteins identified in each group are described in Supplemental Data 1-6. A total of 194 proteins associated with parenchymal A β deposits were identified in APP23 mice (Fig. 1C). Among them, 89 proteins were exclusively found in ThS-positive deposits, including well-known amyloid-associated proteins such as ApoE, ApoJ, and GFAP (Suppl. Data 1). On the other hand, 70 proteins were found to be associated with A β -positive vessels (Suppl. Data 2). However, after exclusion of the proteins identified in parenchymal plaques from APP23 brains and in brain vessels from WT mice, the only proteins exclusively detected in the A β -affected cerebral vasculature were MFG-E8 and TIMP3 (Suppl. Data 3). Because TIMP3 in cerebral vessels from CAA patients has previously been described¹⁵, we focused our study on the other candidate, MFG-E8.

MFG-E8 expression in brain tissue from APP23 transgenic mice

To confirm the proteomic data, immunoblotting was performed on brain homogenates from 12- to 24-month-old mice. MFG-E8 brain levels were significantly higher in 18- and 24-month-old APP23 mice than in age-matched WT mice. Although MFG-E8 levels were strongly associated with genotype, an effect of age was also observed, but only in APP23 mice (Fig. 2A). The plasma levels of MFG-E8 were also determined, although no

significant differences between genotypes were found in 24-month-old mice (Fig. 2A). We next evaluated the distribution of MFG-E8 in the mouse brain by immunofluorescence staining. MFG-E8 was detected in brain vessels from both genotypes, but the number of MFG-E8-positive vessels was significantly higher in APP23 brains than in WT brains (Fig. 2B). Moreover, double immunofluorescence showed that MFG-E8 was detected principally in A β -positive vessels, and it was absent from neuritic plaques (Fig. 2C).



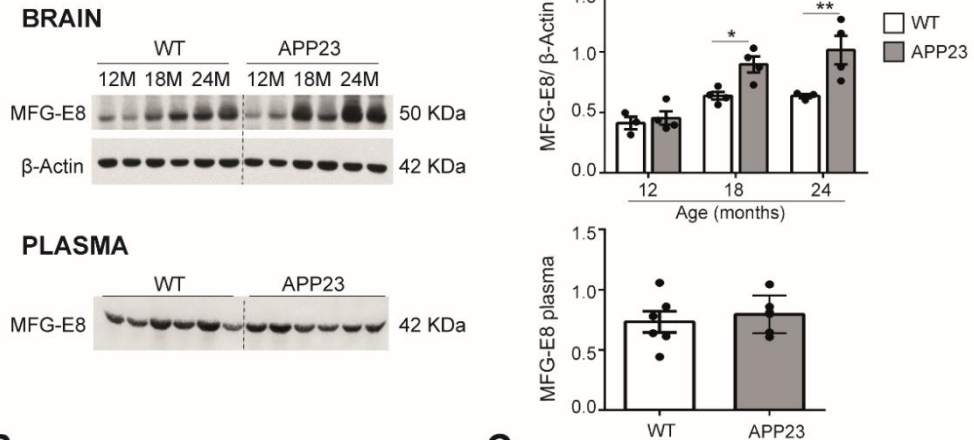
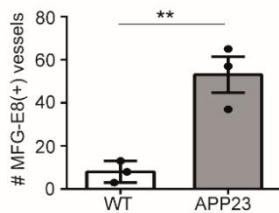
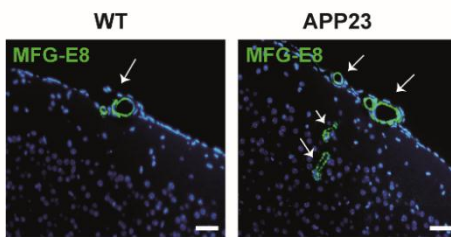
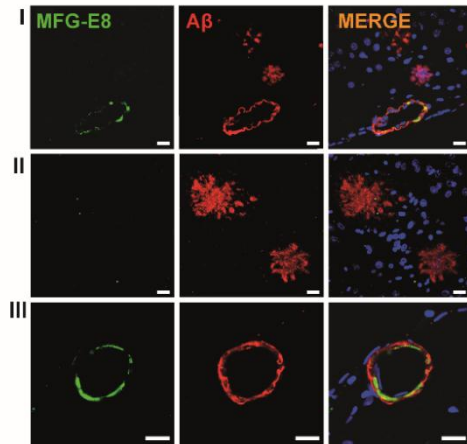
A**B****C**

Figure 2: MFG-E8 expression analysis in APP23 mice. **A)** Representative western blot images and quantification of MFG-E8 protein levels in brain homogenates from 12-, 18-, and 24-month-old WT and APP23 mice and in 24-month-old plasma samples, $n=3-6/\text{group}$. **B)** Representative immunofluorescence images and quantification of the MFG-E8-positive vessels in brains from 24-month-old WT and APP23 mice. The scale bar indicates 100 μm , $n=3/\text{group}$. **C)** Representative confocal images showing the localization of MFG-E8 (green) and A β (red) in parenchymal brain sections (I) from 24-month-old APP23 mice. II) Representative images showing no MFG-E8 detection in parenchymal A β deposits. III) Representative images showing MFG-E8 detection in an A β -positive vessel. The scale bar indicates 10 μm . * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.

MFG-E8 distribution in A β -positive cortical brain vessels from human CAA brains

Next, the expression of MFG-E8 in human *postmortem* cortical brain sections was analysed in a patients diagnosed with pathological CAA and in a control cohort. The principal demographic characteristics, neuropathological features, and cause of death of

all the cases included in the study are described in Suppl. Table 1. Interestingly, strong MFG-E8 staining was detected only in A β -positive vessels in pathological brains, as visualized in consecutive brain sections stained with anti-A β and anti-MFG-E8 in CAA cases (Fig. 3A). In fact, we confirmed the previous results found in APP23 mice in which MFG-E8 detection was restricted to vascular A β pathology, while A β parenchymal plaques did not show any immunoreactivity for MFG-E8. Control cases also showed some MFG-E8 immunoreactivity, although the staining was less pronounced in the brain parenchyma (Fig. 3A) and mostly restricted to leptomeningeal vessels.

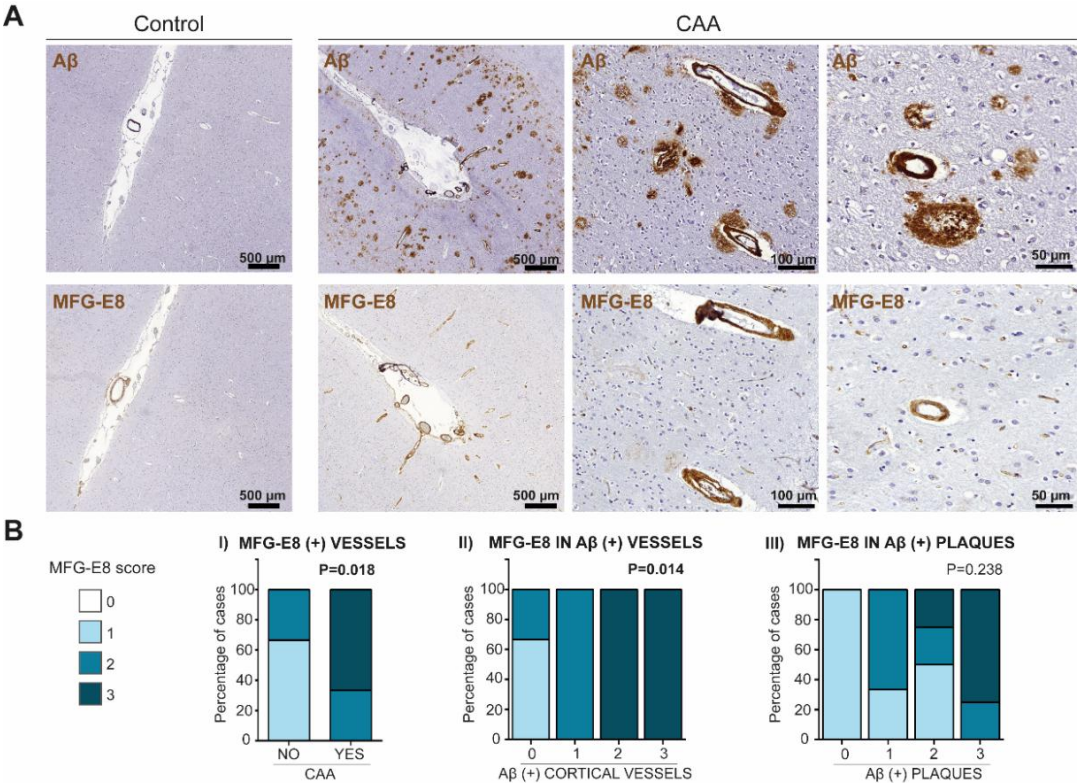


Figure 3: MFG-E8 immunodetection in cortical brain sections from CAA patients and controls. **A)** Representative images of brain A β and MFG-E8 presence in consecutive cortical brain sections from CAA patients or control individuals. **B)** Distribution of MFG-E8 staining according to (I) the presence or absence of CAA pathology and according to the (II) vascular and (III) parenchymal A β pathological burden. The graph shows the percentage of cases in each group. 0: No staining; 1: mild detection (1-50 positive deposits); 2: moderate detection (51-100); 3: intense detection (>100 deposits) in the selected area for each section.

The presence of MFG-E8 and A β in occipital brain sections was then evaluated and scored in the total cohort through IHC. The distribution of MFG-E8-positive vessels was significantly higher in CAA cases than in controls. Indeed, the highest MFG-E8 score was given to 66.6% of CAA cases (4/6), while the lowest score was given to non-CAA cases ($p=0.018$) (Fig. 3B, I). Regarding the distribution of MFG-E8 in A β -positive cortical vessels, significant differences were found between groups. As expected, MFG-E8 immunodetection was strongest in those groups with the highest cerebrovascular A β scores ($p=0.014$) (Fig. 3B, II). Because neuritic plaques were also present in a significant number of CAA cases, MFG-E8 distribution was also analysed according to neuritic plaque load; however, the positivity of MFG-E8 in brain vessels was not significantly associated with the number of A β -positive plaques ($p=0.238$) (Fig. 3B, III). Age was significantly different among groups (CAA cases: 82.3 ± 6.4 yrs; control cases: 74.5 ± 5 yrs; $p=0.04$), but the MFG-E8 immunostaining score was not associated with age or any other neuropathological features evaluated in the total cohort, including the Braak score or Vonsattel rating. MFG-E8 distribution was not associated with the AD pathological risk score or the presence of ICH (Suppl. Table 2)

Circulating MFG-E8 levels

Circulating MFG-E8 levels were evaluated in serum samples from CAA-ICH patients ($n=31$), AD patients ($n=25$), and control participants ($n=39$). However, no differences were found between groups (Suppl. Table 3). Serum MFG-E8 levels were not associated with age, sex or other vascular risk factors (Suppl. Table 4).

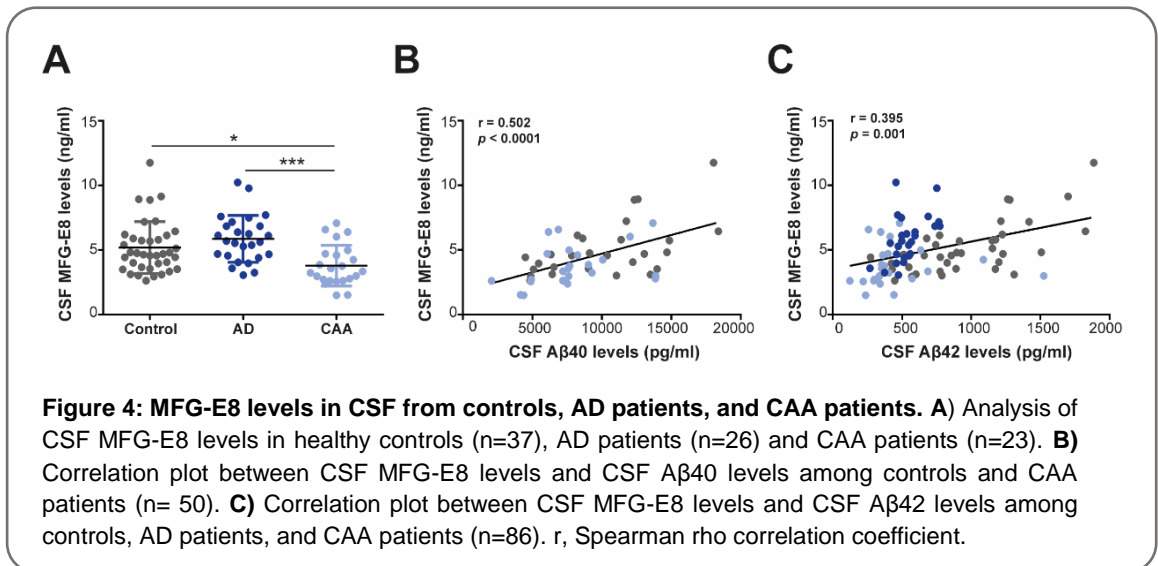
Circulating MFG-E8 levels were further evaluated in CSF samples from healthy controls, CAA patients, and AD patients obtained from two different clinical cohorts. Controls from Radboud UMC and from VHUH were pooled for posterior analysis ($n=37$), as no significant differences were found regarding sex and age or levels of CSF biomarkers (p-Tau, t-Tau and A β 42) between cohorts (Suppl. Table 5). Demographic and levels of CSF markers from all the groups included in the study are shown in Table 1. CAA patients presented significantly lower MFG-E8 levels in CSF (3345.5 (2661.8-4648.3) pg/ml) than AD patients (5655.6 (4552.6-6849.2) pg/ml; $p<0.001$) and control subjects (4569.4 (3533.9-5848.7) pg/ml; $p=0.01$) (Fig. 4A). Differences remained significant after adjustment for age (CAA vs. controls: OR 0.999 95% CI [0.999-1], $p=0.013$; CAA vs. AD: OR 0.999 95% CI [0.999-1], $p=0.001$). Next, the associations of MFG-E8 levels with other CSF biomarkers of the total cohort were evaluated. Interestingly, CSF MFG-E8 levels were positively correlated both with CSF A β 40 ($r=0.502$, $p<0.001$) and A β 42 levels ($r=0.395$, $p=0.001$) in the total cohort (Fig. 4B, 4C), indicating that CSF MFG-E8 levels are fully dependent on A β levels. A weak correlation was also found between MFG-E8 levels and total tau levels in CSF ($r=0.236$, $p=0.004$). However, the concentration of the

MFG-E8 protein in CSF was not associated with age ($r=-0.121$, $p=0.268$) or CSF p-tau levels ($r=0.009$, $p=0.932$).

Table 1: Demographic characteristics and CSF parameters of healthy controls, CAA patients, and AD patients.

	Control (n=37)	CAA (n=23)	AD (n=26)	p-Value
Demographics				
Age, years, mean \pm SD	63.8 \pm 8.5	70.6 \pm 7.8 ^{**}	64.3 \pm 7.3 [§]	0.004
Sex (female), n (%)	11 (29.7%)	7 (30.4%)	14 (53.8%)	0.110
CSF parameters, pg/ml				
A β 40, mean \pm SD	10187.9 \pm 4009.1	7911.1 \pm 3140.1	-	0.032
A β 42, median (IQR)	895.1 (678-1225)	360 (317.5-462) ^{***}	514.6 (468.6-593.5) ^{***}	<0.001
t-Tau, median (IQR)	231 (170-317)	403 (268-512.5) ^{**}	328.6 (183.4-395.3)	0.002
p-Tau, median (IQR)	28 (19-39)	45 (33.5-63.5) ^{**}	32.4 (18.1-39.6) [§]	0.001
MFG-E8, median (IQR)	4568.4 (3672.3-5898)	3345.5 (2661.8-4648.3) [*]	5655.6 (4552.6-6849.2) ^{§§§}	<0.001

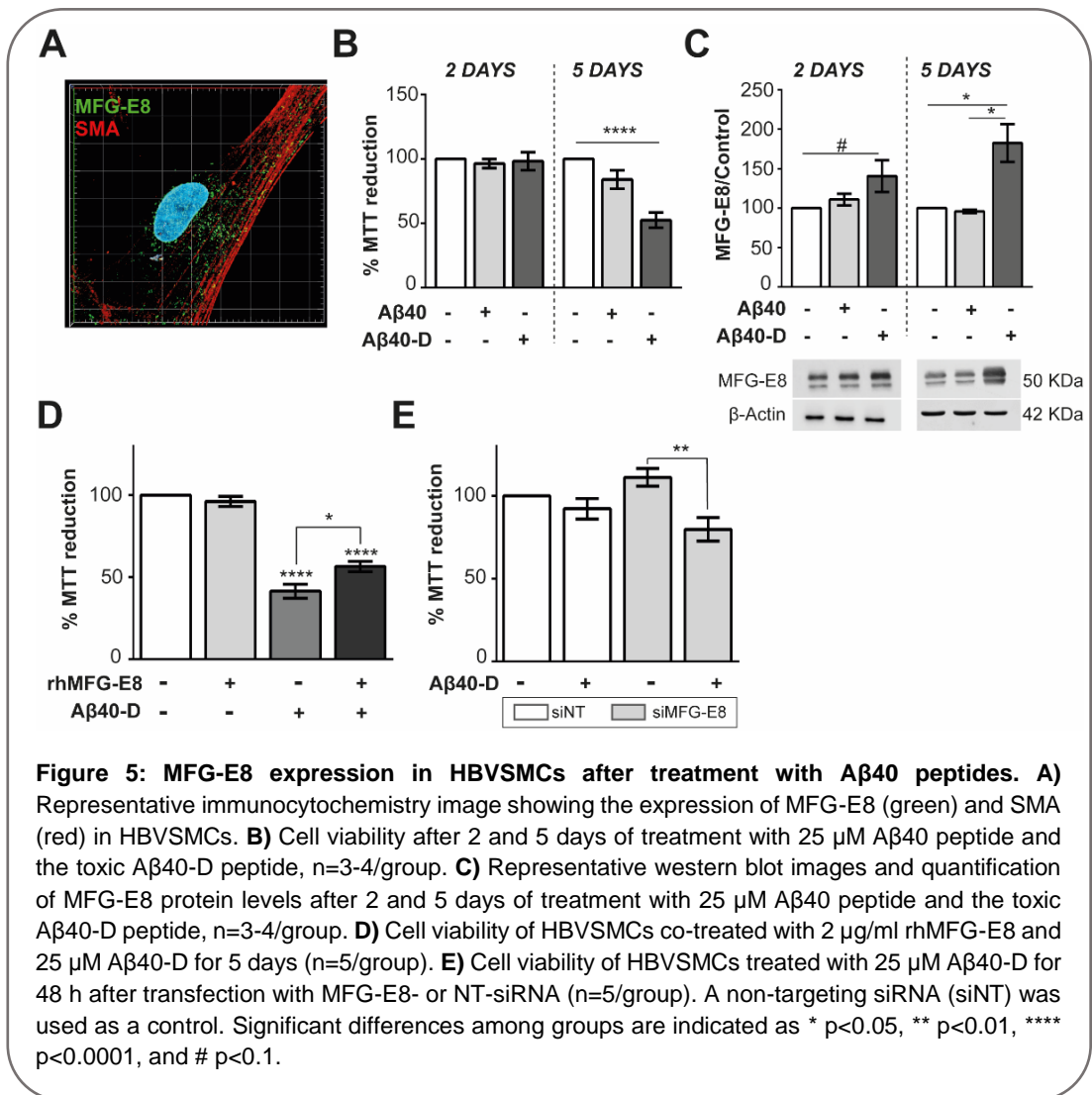
Abbreviations: CAA, Cerebral amyloid angiopathy; AD, Alzheimer's disease; CSF, cerebrospinal fluid; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; -, not known. p-values below 0.05 are shown in bold: * $p<0.05$ vs. the control group; ** $p<0.01$ vs. the control group; *** $p<0.001$ vs. the control group; § $p<0.05$ vs. the CAA group; §§§ $p<0.001$ vs. the CAA group.



Modulation of MFG-E8 expression by different A β -40 peptides in cultured HBVSMCs

Vascular smooth muscle cells are widely known to express MFG-E8³⁹. Double immunostaining of MFG-E8 and SMA was performed to validate the in vitro model used,

and confirmed the expression of MFG-E8 in HBVSMCs (Fig. 5A). The toxicity of two A β 40 peptides, A β 40-wt and A β 40-D, on cell viability was determined. Whereas no cytotoxicity was induced by A β 40 in brain vascular cells cultured under the conditions tested, a significant decrease in cell viability was observed after 5 days of treatment with the mutant A β 40-D peptide (46.5% reduction vs control, $p < 0.0001$) (Fig. 5B). Interestingly, MFG-E8 protein levels were significantly increased only in HBVSMCs after 5 days of treatment with the toxic A β 40-D peptide (79.3% increase vs control, $p = 0.02$), and a tendency towards increased MFG-E8 expression was also observed after 2 days of treatment with the A β 40-D peptide (36% increase vs control, $p = 0.09$) (Fig. 5C). However, no differences in MFG-E8 expression were shown after treatment with the nontoxic A β 40 peptide.



We next investigated whether exogenous administration of rhMFG-E8 was able to impact HBVSMC viability. Notably, no significant differences were found between non-treated cells and those treated with rhMFG-E8 (Fig. 5D), indicating that MFG-E8 was not cytotoxic to HBVSMCs under the conditions tested. However, co-administration of rhMFG-E8 protein and A β 40-D peptide significantly reduced the A β 40-D-induced cytotoxicity in HBVSMCs compared to cells treated with A β 40-D alone (38.3% reduction in toxicity vs cells treated with A β 40-D, $p=0.007$) (Fig. 5D). Finally, to further confirm that MFG-E8 could play a protective role in CAA pathology by attenuating A β 40-D cytotoxicity, MFG-E8 depletion was evaluated. HBVSMCs were treated with 1 μ M MFG-E8-specific siRNA for 48 h and then subjected to 2 days of A β 40-D treatment. The efficiency of MFG-E8 silencing was confirmed by RT-qPCR and western blot analyses 48 h post transfection (Suppl. Fig. 2). Remarkably, MFG-E8 silencing exacerbated the slight A β 40-D cytotoxicity observed at 2 days in HBVSMCs compared to that in non-transfected cells (14.1% increase in toxicity vs non-transfected cells treated with A β 40-D, $p<0.001$) (Fig. 5E).

DISCUSSION

Interest in understanding the pathological interactions between AD and CAA has grown considerably in recent years. The discovery of new markers related to cerebral A β deposition is crucial for a better comprehension of the underlying pathological mechanisms and could support the development of novel potential disease-modifying therapies. In the present study, we used an approach combining LCM and proteomics to identify new proteins specifically associated with vascular A β in a widely used transgenic mouse model of cerebral β -amyloidosis. Our proteomic data confirmed the presence of proteins already well known to be related to parenchymal and vascular A β deposits, such as ApoJ and ApoE^{17,40–42}. Remarkably, we identified two proteins selectively associated with cerebrovascular A β , TIMP3 and MFG-E8. We focused our study on the MFG-E8 candidate since TIMP3 has been previously described in vessels from CAA patients^{15,43}. Our proteomic results demonstrated that the LCM approach using an experimental transgenic model was a reliable tool that successfully validated candidates previously identified in other studies on humans.

MFG-E8 is a multifunctional glycoprotein expressed by a wide variety of cells, including epithelial cells, vascular smooth muscle cells, dendritic cells, microglia and astrocytes⁴⁴. It has previously been associated with several physiological and pathological functions in the CNS, including phagocytosis of apoptotic cells^{22,25,45}, anti-inflammation^{46,47}, and tissue regeneration²⁴, among others. In this regard, it has been shown that MFG-E8 binds to the A β 42 peptide and increases microglial neuroprotective activity against oligomeric

A β toxicity in vitro, suggesting that MFG-E8 can facilitate the clearance of A β by glial cells^{29,30}. The beneficial role of this protein in cerebral ischaemia has been extensively studied in mice, in which MFG-E8 treatment reduces the infarct volume and the expression of inflammatory cytokines^{48,49}. The anti-inflammatory and anti-apoptotic roles of MFG-E8 have also been described in MFG-E8-deficient mice with transient occlusion of the middle cerebral artery^{50,51} and in rat models of traumatic brain injury administered rhMFG-E8⁵². Additionally, a recent study also revealed that intra-cerebroventricular MFG-E8 administration after subarachnoid haemorrhage induction in mice decreases brain oedema by attenuating inflammation⁵³. However, to the best of our knowledge, this is the first time that the MFG-E8 protein has been associated with vascular A β in CAA pathology.

In the CAA/AD experimental model, using immunofluorescence techniques, we detected an increased presence of MFG-E8 protein in A β -positive vessels from APP23 brains, while this protein was absent from parenchymal A β deposits, which supported the previous proteomic findings. Furthermore, we confirmed these results in human *postmortem* cortical brain tissues from CAA patients. Indeed, a strong association between MFG-E8 presence and A β -affected cortical vessels, but not the parenchymal A β burden, was observed. In fact, we found that MFG-E8 expression was not related to the neuropathologically assessed risk score for AD. A previous study published using human *postmortem* brain samples found decreased total mRNA MFG-E8 levels in AD brains compared to controls²⁹. That study did not analyse gene expression in CAA brain samples and/or did not describe the prevalence of CAA pathology in the AD patient cohort, which makes it incomparable to our study. However, it should be noted that the previous study found low MFG-E8 protein expression in neuritic plaque-enriched areas, which would be in agreement with our results, in which no MFG-E8 immunoreactivity was detected in parenchymal A β deposits. On the other hand, the association of medin, a small fragment derived from MFG-E8 cleavage, with AD and vascular dementia has been recently described; previous studies have reported higher levels of medin in the cerebral arterioles from AD and vascular dementia patients than in those from controls⁵⁴. Medin is one of the most common forms of ageing-related amyloid and accumulates in the vasculature, presenting a strong affinity to elastin fibres⁵⁵. Increasing evidence suggests that medin may cause vascular dysfunction in ageing arteries and could contribute to age-associated vascular decline^{56–58}, although little is known about its physiological or pathologic effects and the mechanism by which it is cleaved from MFG-E8. In this line, a direct link between MFG-E8 and ageing has also been demonstrated^{59–61}. However, in our study, MFG-E8 was not associated with age in the human cohorts analysed. Nevertheless, we detected MFG-E8 expression in specific vessels from healthy control subjects and in WT mice, and a significant association was found between MFG-E8 brain

levels and ageing in APP23 mice when mice with a wide age range were included in the study. Taken together, the results indicate that the involvement of MFG-E8 expression in vascular ageing under physiological and pathological conditions merits further investigation.

Our results showing specific MFG-E8 accumulation in the A β -associated pathological cerebrovasculature raised questions regarding the cellular origin and the modulation of protein expression. In this regard, because MFG-E8 was not detected in parenchymal deposits or expressed in microglia or other parenchymal cells, it is plausible to assume that the elevated presence of the protein could have resulted from its expression in cerebrovascular cells or from a peripheral source. To test this latter possibility, we analysed the circulating MFG-E8 levels in the serum of CAA patients. In fact, previous studies have described elevated circulating levels of MFG-E8 in patients with different inflammatory diseases^{62,63} and have observed an association between elevated MFG-E8 serum levels and the presence of high-intensity cerebral lesions on MRI⁶⁴. Thus, we hypothesized that serum MFG-E8 may be modified in CAA patients, in whom the high prevalence of white matter lesions is well described^{2,65}. However, no differences were found in serum levels in CAA patients compared to AD cases or controls. In contrast, in CSF samples, lower MFG-E8 levels were found in CAA group samples than in both AD and control group samples. Interestingly, the CSF biomarker profiles for the clinical patient cohorts used in our study are consistent with previously reported data⁶⁶⁻⁶⁸. CAA patients presented lower A β 42 and A β 40 levels than controls. Interestingly, we found a positive correlation between MFG-E8 levels and A β 40 and A β 2 levels in the CSF, demonstrating, again, the strong association of this protein with A β levels. It has been hypothesized that CSF biomarker levels may reflect neuropathological changes in the brain^{69,70}. In this sense, the decreased A β levels in the CSF of CAA and AD patients may indicate possible impairment of the clearance of the peptide, potentially through the perivascular drainage pathway, which could explain the altered deposition of A β in the brain⁷¹. Similarly, our results demonstrate that MFG-E8 protein strongly accumulates in the cerebral vasculature of CAA patients, which may explain the reduced MFG-E8 concentrations in the CSF of these patients. In contrast, as MFG-E8 is absent from parenchymal A β deposits, no differences were observed in the CSF levels of MFG-E8 in AD patients. Recent studies have also pointed out the potential usefulness of biomarkers measured in the CSF for CAA diagnosis, such as apolipoprotein D (ApoD)⁷². However, further studies and confirmation in independent cohorts are needed to elucidate whether measurement of CSF MFG-E8 levels could be used to differentiate cerebrovascular pathology from parenchymal A β deposition and whether CSF MFG-E8 could be combined with other biomarkers, such as ApoD or A β /p-Tau, to improve the accuracy of CAA diagnosis. Notably, although healthy controls and AD patients were selected for not

presenting a history of stroke, the known overlap between AD and CAA makes the patient selection method an intrinsic limitation of the study.

To determine the possible functional implication of MFG-E8 in CAA pathology, we simulated the pathological scenario by treating HBVSMCs with A β 40, the most prominent peptide that accumulates in CAA, and A β 40-D, the mutant form generated in HCHWA-D patients. Consistent with the findings of previous studies, only treatment with the A β 40-D peptide induced a significant decrease in HBVSMC viability, confirming its highly toxic response^{73,74}. Several studies have shown that MFG-E8 is abundantly expressed in vascular smooth muscle cells^{39,55,59}. In this regard, we found specific increases in MFG-E8 protein levels only after treatment with the toxic A β 40-D peptide. Previous studies have shown that exogenous MFG-E8 significantly increases the expression of pro-inflammatory genes in vascular smooth muscle cells isolated from the thoracic aortas of aged mice⁵⁹. However, under the conditions evaluated, cell viability was not altered after rhMFG-E8 treatment in human brain vascular smooth muscle cells. Indeed, we found that rhMFG-E8 supplementation significantly increased cell viability after A β 40-D treatment and, complementarily, silencing of MFG-E8 increased A β 40-D-induced toxicity. Altogether, these results suggest that MFG-E8 could play a protective role in CAA pathology, potentially reducing the cytotoxicity of A β . Whether MFG-E8 participates in A β phagocytosis or acts by attenuating the inflammation induced at the vascular level and reducing neuronal apoptosis requires further investigation.

In summary, this study covered different aspects of the relation of MFG-E8 with CAA pathology; we started with an experimental approach using a mouse transgenic model; then studied the levels of MFG-E8 in the brain, blood and CSF; and finally explored the effects of modulating MFG-E8 expression in cultured human smooth muscle cells. Overall, we have demonstrated that data obtained with an LCM proteomics approach using an experimental model of β -amyloidosis can be successfully translated to human studies. Our results indicate that MFG-E8 is closely associated with CAA; MFG-E8 levels are increased in cerebral A β -positive vessels but decreased in CSF from CAA patients. Finally, we have shown that MFG-E8 expression is increased in HBVSMCs by toxic A β variants, which may prevent the vascular damage induced by A β . The discovery of MFG-E8 as a specific novel marker for CAA opens up new opportunities to explore more accurate diagnostic tools and potential therapeutic approaches for CAA. Additional *in vivo* functional studies are required to elucidate the molecular pathways involved in the protective role of MFG-E8 in CAA pathology.

FUNDING

This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), (PI20/00465), co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). The Neurovascular Research Laboratory is part of the INVICTUS+ network, ISCIII, Spain (RD16/0019/0021). P.M. held a predoctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute. MMV is supported by the BIONIC project (no. 733050822, which has been made possible by ZonMW as part of 'Memorabel', the research and innovation program for dementia, as part of the Dutch national 'Deltaplan for Dementia':the CAFÉ project (the National Institutes of Health, USA, grant number 5R01NS104147-02), and a grant from the Selfridges Group Foundation (NR170024). The BIONIC project is a consortium of Radboudumc, LUMC, ADX Neurosciences, and Rhode Island University.

BIBLIOGRAPHY

1. Vinters H V. Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2015. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-163927
2. Boulouis G, Charidimou A, Greenberg SM. Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy: Pathophysiology, Neuroimaging Features, and Clinical Implications. *Semin Neurol.* 2016. doi:10.1055/s-0036-1581993
3. Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. Alzheimer's Disease International. Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors. *Alzheimer's Dis Int.* 2014.
4. Hanger HC, Wilkinson TJ, Fayez-Iskander N, Sainsbury R. The risk of recurrent stroke after intracerebral haemorrhage. *J Neurol Neurosurg & Psychiatry.* 2007;78(8):836-840. doi:10.1136/jnnp.2006.106500
5. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* 2017;140(7):1829-1850. doi:10.1093/brain/awx047
6. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018. doi:10.1111/ene.13439
7. Vinters H V. Cerebral amyloid angiopathy a critical review. *Stroke.* 1987. doi:10.1161/01.STR.18.2.311
8. Jäkel L, De Kort AM, Klijn CJM, Schreuder FHBM VM. Prevalence of cerebral amyloid angiopathy: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement.* 2021:19.
9. Revesz T, Holton JL, Lashley T, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol.* 2009;118(2):321-321. doi:10.1007/s00401-009-0555-7
10. 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. doi:10.1002/ana.22112

11. Suzuki N, Iwatsubo T, Odaka A, Ishibashi Y, Kitada C, Ihara Y. High tissue content of soluble β 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol.* 1994.
12. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol.* 2011;70(6):871-880. doi:10.1002/ana.22516
13. 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. doi:10.1038/s41582-019-0281-2
14. Maat-Schieman MLC, Radder CM, Haan J, Roos RAC, van Duinen SG. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch): a model for congophilic plaque formation without neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol.* 1994. doi:10.1007/BF00310382
15. Manousopoulou A, Gatherer M, Smith C, et al. 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(6):492-504. doi:10.1111/nan.12342
16. Hondius DC, Eigenhuis KN, Morrema THJ, et al. Proteomics analysis identifies new markers associated with capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):46. doi:10.1186/s40478-018-0540-2
17. Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, et al. Apolipoprotein E and clusterin inhibit the early phase of amyloid- β aggregation in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2019. doi:10.1186/s40478-019-0662-1
18. Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, et al. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 2017;134(4):605-617. doi:10.1007/s00401-017-1720-z
19. Drummond E, Nayak S, Faustin A, et al. Proteomic differences in amyloid plaques in rapidly progressive and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2017. doi:10.1007/s00401-017-1691-0
20. Xiong F, Ge W, Ma C. Quantitative proteomics reveals distinct composition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2019. doi:10.1016/j.jalz.2018.10.006
21. Taylor MR. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion. *DNA Cell Biol.* 1997. doi:10.1089/dna.1997.16.861
22. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science (80-).* 2004;304(5674):1147-1150. doi:10.1126/science.1094359
23. Silvestre JS, Théry C, Hamard G, et al. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med.* 2005;11(5):499-506. doi:10.1038/nm1233
24. Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, et al. MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing. *Am J Pathol.* 2014;184(7):1981-1990. doi:10.1016/j.ajpath.2014.03.017
25. Fuller AD, Van Eldik LJ. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic

- neurons. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(4):246-256. doi:10.1007/s11481-008-9118-2
26. Fricker M, Neher JJ, Zhao JW, Théry C, Tolkovsky AM, Brown GC. MFG-E8 mediates primary phagocytosis of viable neurons during neuroinflammation. *J Neurosci.* 2012;32(8):2657-2666. doi:10.1523/JNEUROSCI.4837-11.2012
 27. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood.* 2009;113(6):1332-1339. doi:10.1182/blood-2008-07-167148
 28. Zhou Y, Cai W, Zhao Z, et al. Lactadherin promotes microvesicle clearance to prevent coagulopathy and improves survival of severe TBI mice. *Blood.* 2018;131(5):563-572. doi:10.1182/blood-2017-08-801738
 29. Boddaert J, Kinugawa K, Lambert JC, et al. Evidence of a role for lactadherin in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2007;170(3):921-929. doi:10.2353/ajpath.2007.060664
 30. Li E, Noda M, Doi Y, et al. The neuroprotective effects of milk fat globule-EGF factor 8 against oligomeric amyloid β toxicity. *J Neuroinflammation.* 2012;9(1):636. doi:10.1186/1742-2094-9-148
 31. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. doi:10.1073/pnas.94.24.13287
 32. Greenberg SM, Vonsattel JPG. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke.* 1997. doi:10.1161/01.STR.28.7.1418
 33. Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002. doi:10.1093/jnen/61.3.282
 34. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2012. doi:10.1016/j.jalz.2011.10.007
 35. 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. doi:10.1007/s00401-006-0127-z
 36. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1991. doi:10.1212/wnl.41.4.479
 37. Linn J, Halpin A, Demaerel P, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology.* 2010;74(17):1346-1350. doi:10.1212/WNL.0b013e3181dad605
 38. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, 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 Dement.* 2011. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
 39. Wang M, Fu Z, Wu J, et al. MFG-E8 activates proliferation of vascular smooth muscle cells via integrin signaling. *Aging Cell.* 2012. doi:10.1111/j.1474-

9726.2012.00813.x

40. Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1996. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66062429.x
41. Verbeek MM, Otte-Höller I, Veerhuis R, Ruiten DJ, De Waal RMW. Distribution of A β -associated proteins in cerebrovascular amyloid of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1998. doi:10.1007/s004010050944
42. 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. doi:10.3389/fneur.2019.00187
43. Jäkel L, Kuiperij HB, Gerding LP, et al. Disturbed balance in the expression of MMP9 and TIMP3 in cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral haemorrhage. *Acta Neuropathol Commun*. 2020. doi:10.1186/s40478-020-00972-z
44. Ni YQ, Zhan JK, Liu YS. Roles and mechanisms of MFG-E8 in vascular aging-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2020. doi:10.1016/j.arr.2020.101176
45. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. 2002;417(6885):182-187. doi:10.1038/417182a
46. Xiao Y, Li G, Chen Y, et al. Milk fat globule-epidermal growth factor-8 pretreatment attenuates apoptosis and inflammation via the integrin- β 3 pathway after surgical brain injury in rats. *Front Neurol*. 2018;9(FEB):1-11. doi:10.3389/fneur.2018.00096
47. Huang W, Wu J, Yang H, et al. Milk fat globule-EGF factor 8 suppresses the aberrant immune response of systemic lupus erythematosus-derived neutrophils and associated tissue damage. *Cell Death Differ*. 2017. doi:10.1038/cdd.2016.115
48. Deroide N, Li X, Lerouet D, et al. MFG-E8 inhibits inflammasome-induced IL-1 β production and limits postischemic cerebral injury. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1176-1181. doi:10.1172/JCI65167
49. Choi J II, Kang HY, Han C, Woo DH, Kim JH, Park DH. Milk fat globule-epidermal growth factor VIII ameliorates brain injury in the subacute phase of cerebral ischemia in an animal model. *J Korean Neurosurg Soc*. 2020;63(2-163 170):163-170. doi:10.3340/jkns.2019.0188
50. Cheyuo C, Jacob A, Wu R, et al. Recombinant human MFG-E8 attenuates cerebral ischemic injury: Its role in anti-inflammation and anti-apoptosis. *Neuropharmacology*. 2012. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.09.018
51. Cheyuo C, Aziz M, Yang WL, Jacob A, Zhou M, Wang P. Milk fat globule-EGF factor VIII attenuates CNS injury by promoting neural stem cell proliferation and migration after cerebral ischemia. *PLoS One*. 2015;10(4):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0122833
52. Gao YY, Zhang ZH, Zhuang Z, et al. Recombinant milk fat globule-EGF factor-8 reduces apoptosis via integrin β 3/FAK/PI3K/AKT signaling pathway in rats after traumatic brain injury. *Cell Death Dis*. 2018. doi:10.1038/s41419-018-0939-5

53. Gao YY, Tao T, Wu D, et al. MFG-E8 attenuates inflammation in subarachnoid hemorrhage by driving microglial M2 polarization. *Exp Neurol*. 2021. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113532
54. Migrino RQ, Karamanova N, Truran S, et al. Cerebrovascular medin is associated with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit*. 2020. doi:10.1002/dad2.12072
55. Miura Y, Tsumoto H, Iwamoto M, et al. Age-associated proteomic alterations in human aortic media. *Geriatr Gerontol Int*. 2019;19(10):1054-1062. doi:10.1111/ggi.13757
56. Migrino RQ, Davies HA, Truran S, et al. Amyloidogenic medin induces endothelial dysfunction and vascular inflammation through the receptor for advanced glycation endproducts. *Cardiovasc Res*. 2017. doi:10.1093/cvr/cvx135
57. Degenhardt K, Wagner J, Skodras A, et al. Medin aggregation causes cerebrovascular dysfunction in aging wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020. doi:10.1073/pnas.2011133117
58. Karamanova N, Truran S, Serrano GE, et al. Endothelial Immune Activation by Medin: Potential Role in Cerebrovascular Disease and Reversal by Monosialoganglioside-Containing Nanoliposomes. *J Am Heart Assoc*. 2020. doi:10.1161/JAHA.119.014810
59. Chiang HY, Chu PH, Lee TH. MFG-E8 mediates arterial aging by promoting the proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):1-14. doi:10.1186/s12929-019-0559-0
60. Wang M, Wang H, Lakatta E. Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor VIII Signaling in Arterial Wall Remodeling. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11(5):768-776. doi:10.2174/1570161111311050014
61. Fu Z, Wang M, Gucek M, et al. Milk fat globule protein epidermal growth factor-8: A pivotal relay element within the angiotensin II and monocyte chemoattractant protein-1 signaling cascade mediating vascular smooth muscle cells invasion. *Circ Res*. 2009. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.187088
62. Yamaguchi H, Takagi J, Miyamae T, et al. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol*. 2008. doi:10.1189/jlb.1107730
63. Yamamoto N, Yamaguchi H, Ohmura K, et al. Serum milk fat globule epidermal growth factor 8 elevation may subdivide systemic lupus erythematosus into two pathophysiologically distinct subsets. *Lupus*. 2014. doi:10.1177/0961203314523870
64. Kishi C, Motegi SI, Ishikawa O. Elevated serum MFG-E8 level is possibly associated with the presence of high-intensity cerebral lesions on magnetic resonance imaging in patients with systemic lupus erythematosus. *J Dermatol*. 2017;44(7):783-788. doi:10.1111/1346-8138.13791
65. Smith EE, Gurol ME, Eng JA, et al. White matter lesions, cognition, and recurrent hemorrhage in lobar intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2004. doi:10.1212/01.WNL.0000142966.22886.20
66. Verbeek MM, Kremer BPH, Rikkert MO, Van Domburg PHMF, Skehan ME,

- Greenberg SM. Cerebrospinal fluid amyloid β 40 is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2009. doi:10.1002/ana.21694
67. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016. doi:10.1016/S1474-4422(16)00070-3
68. Charidimou A, Friedrich JO, Greenberg SM, Viswanathan A. Core cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology*. 2018. doi:10.1212/WNL.0000000000005030
69. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, et al. Cerebrospinal fluid β -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol*. 2009. doi:10.1001/archneurol.2008.596
70. Seppälä TT, Nerg O, Koivisto AM, et al. CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology*. 2012. doi:10.1212/WNL.0b013e3182563bd0
71. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, et al. Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(8):457-470. doi:10.1038/nrneurol.2015.119
72. Kuiperij HB, Hondius DC, Kersten I, et al. Apolipoprotein D: a potential biomarker for cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2020. doi:10.1111/nan.12595
73. Davis J, Van Nostrand WE. Enhanced pathologic properties of Dutch-type mutant amyloid β -protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. doi:10.1073/pnas.93.7.2996
74. Previti M Lou, Zhang W, Van Nostrand WE. Dexamethasone diminishes the pro-inflammatory and cytotoxic effects of amyloid β -protein in cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neuroinflammation*. 2006. doi:10.1186/1742-2094-3-18

LACTADHERIN (MFG-E8): A NOVEL MARKER ASSOCIATED WITH CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY

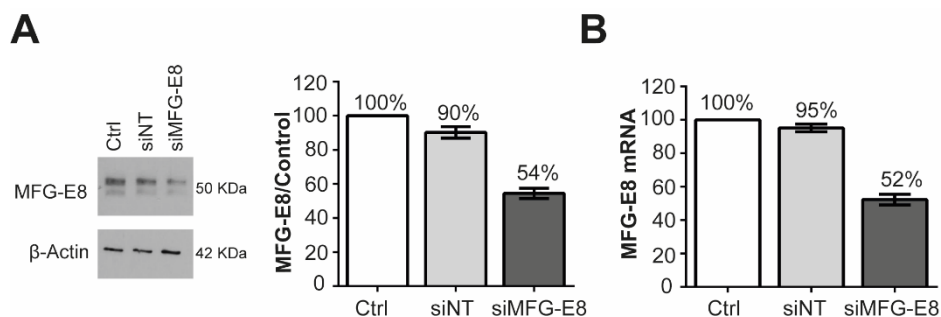
Paula Marazuela¹, Montse Solé¹, Anna Bonaterra-Pastra¹, Jesús Pizarro¹, Jessica Camacho², Elena Martínez-Sáez², H. Bea Kuiperij³, Marcel M.Verbeek^{3,4}, A. Kort³, F. Schreuder³, K. Klijn³, Laura Castillo-Ribelles⁵, Olalla Pancorbo⁶, David Rodríguez-Luna⁶, Francesc Pujadas⁷, Pilar Delgado¹, Mar Hernández-Guillamon^{1,*}

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SUPPLEMENTARY FIGURES



Suppl. Fig. 1: Domain structure and coverage of the murine MFG-E8 sequence and the peptides detected by mass spectrometry. Yellow blocks indicate sequences covered with peptides found in MS/MS runs.



Suppl. Fig. 2: Western blot (A) and qPCR (B) results showing the gene silencing efficiency of the siRNA sequence targeting MFG-E8 in HBVSMCs. HBVSMCs were treated with 1 μ M MFG-E8 siRNA or non-targeting siRNA for 48 hours. Ctrl, control; siNT, non-targeting siRNA.

SUPPLEMENTARY TABLES

Suppl. Table 1: Cause of death and patient demographic and neuropathological characteristics.

Case	Age	Sex	AD	ABC	Braak	CAA	CAA type	Vonsattel	ICH	Cause of death
1	83	M	Yes	A3B3C3	III	Yes	I	IV	No	-
2	81	F	Yes	A3B3C3	III	Yes	I	III	Yes	ICH
3	73	M	No	A1B1C1	I	Yes	I	II	Yes	Infective endocarditis
4	93	F	Yes	A2B2C3	II	Yes	II	I	No	Mesenteric thrombosis
5	81	F	Yes	A2B2C1	*	Yes	I	III	No	Ischemic stroke
6	83	M	Yes	A3B2C2	II	Yes	II	II	No	-
7	70	F	No	A0B1C0	I	No	N/A	N/A	No	PML
8	75	M	No	A0B1C0	I	No	N/A	N/A	No	Metastatic lung cancer
9	79	M	No	A1B0C2	0	No	N/A	N/A	Yes	ICH
10	82	F	No	A2B1C1	I	No	N/A	N/A	No	Ischemic cardiomyopathy
11	71	M	No	A0B1C0	I	No	N/A	N/A	No	Multiple myeloma
12	70	F	No	A1B0C0	0	No	N/A	N/A	No	Bacterial pneumonia

Abbreviations: F, female; M, male; AD, Alzheimer's disease; CAA, Cerebral Amyloid Angiopathy; ICH, Intracerebral hemorrhage; N/A, not applicable; -, not known; PML, Progressive multifocal leukoencephalopathy. *, Braak stages could not be determined due to the presence of other associated-tau-pathologies.

Suppl. Table 2: Univariate analysis of MFG-E8 distribution according to the demographic and neuropathological characteristics of the CAA brain cohort.

Variable	p-Value
Age	0.151
Sex	0.369
ABC	0.220
Braak	0.307
CAA type	0.075
Vonsattel	0.265
ICH	0.264

Abbreviations: ICH, Intracerebral hemorrhage.

Suppl. Table 3: Demographic and clinical characteristics of CAA-ICH patients, AD patients, and healthy controls.

Variable	Control (n=39)	CAA-ICH (n=31)	AD (n=25)	p-Value
Age, years, median (IQR)	75 (71-78.5)	77 (71.5-80)	80 (75-82)	0.069
Sex (female), n (%)	20 (51.3%)	16 (51.6%)	19 (76%)	0.102
Hypertension, n (%)	18 (60%)	15 (53.6%)	16 (64%)	0.736
Diabetes, n (%)	5 (16.7%)	6 (24%)	5 (20%)	0.795
Dyslipidemia, n (%)	10 (33.3%)	5 (22.7%)	-	0.404
Serum MFG-E8, pg/ml, median (IQR)	2636.6 (1959.6-3912.1)	2099.3 (1755.1-3053.9)	2488.9 (1878.9-3318.5)	0.184

Abbreviations: CAA-ICH, Cerebral amyloid angiopathy-associated intracerebral hemorrhage; AD, Alzheimer's disease; IQR, interquartile range; -, not known.

Suppl. Table 4: Univariate analysis of circulating MFG-E8 levels according to demographic and clinical characteristics of the total cohort.

Variable	Serum MFG-E8 levels (pg/ml)		p-Value
	Yes	No	
Age	r = - 0.061		0.556
Sex (female)	2382.5 (1879.1-3198.4) n=55	2594.6 (1719.6-3973.6) n=40	0.667
Hypertension	2488.9 (1878.9-3237.1) n=49	2120.1 (1666.2-3194.9) n=34	0.517
Diabetes	2794.7 (2322.6-3302.1) n=16	2151.6 (1695.7-3198.4) n=64	0.095
Dyslipidemia	2313.6 (1845.2-3518.4) n=15	2162.4 (1774.7-3042.3) n=37	0.525

Data are expressed as median picograms per milliliter (interquartile range). r, Spearman's rho correlation.

Suppl. Table 5: Demographic characteristics and CSF parameters of controls from both cohorts

	Radboud UMC Control (n=27)	VHUH Control (n=10)	p- Value	Total (n=37)
Demographics				
Age, years, mean \pm SD	64.4 \pm 8	62.1 \pm 10.1	0.468	63.8 \pm 8.5
Sex (female), n (%)	8 (29.6%)	3 (30.0%)	0.983	11 (29.7%)
CSF parameters, pg/ml				
A β 42, median (IQR)	890 (586-1222)	905.3 (777-1225)	0.846	895.1 (678-1225)
t-Tau, median (IQR)	248 (200-327.5)	188.7 (137.7- 218.2)	0.718	231 (170-317)
p-Tau, median (IQR)	37 (27-42)	13.4 (11.3-18.0)	0.120	28 (19-39)
MFG-E8, median (IQR)	4569.4 (3533.9- 5848.7)	5257.2 (4440.1- 6193.3)	0.378	4568.4 (3672.3- 5898)

Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; UMC, University Medical Center; HUVH, Vall d'Hebron University Hospital

SUPPLEMENTARY DATA

List of proteins found by mass spectrometry:

- (1)** Detected proteins in A β plaques.
- (2)** Detected proteins in WT brain vessels.
- (3)** Detected proteins in A β -positive vessels.
- (4)** Common identified proteins between A β plaques and A β vessels.
- (5)** Common identified proteins between WT brain vessels and A β vessels.
- (6)** Common identified proteins between A β plaques and WT brain vessels.
- (7)** Common identified proteins among the three experimental groups.

Supplementary Data 1. Detected proteins in A β plaques

#	Accession	Description
1	TBB2B	Tubulin beta-2B chain
2	TBB4A	Tubulin beta-4A chain
3	AT1A3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3
4	TBB3	Tubulin beta-3 chain
5	ALP2	Amyloid-like protein 2
6	LRP1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1
7	STXB1	Syntaxin-binding protein 1
8	NSF	Vesicle-fusing ATPase
9	KCC2A	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha
10	SNP25	Synaptosomal-associated protein 25
11	EAA2	Excitatory amino acid transporter 2
12	STX1B	Syntaxin-1B
13	NRX1A	Neurexin-1
14	DYN1	Dynamin-1
15	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
16	CYTC	Cystatin-C
17	MAP6	Microtubule-associated protein 6
18	EAA1	Excitatory amino acid transporter 1
19	PP2BA	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform
20	SPON1	Spondin-1
21	VPP1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1
22	SYN1	Synapsin-1
23	VATB2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform
24	DYHC1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
25	RAB3A	Ras-related protein Rab-3A
26	MYPR	Myelin proteolipid protein
27	OLFL3	Olfactomedin-like protein 3
28	SYT1	Synaptotagmin-1
29	VA0D1	V-type proton ATPase subunit d 1
30	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein
31	GBB2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
32	VAMP2	Vesicle-associated membrane protein 2
33	MYH10	Myosin-10
34	SEPT7	Septin-7
35	APOD	Apolipoprotein D
36	ARL8A	ADP-ribosylation factor-like protein 8A
37	C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C
38	C1QT4	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 4
39	CNTN1	Contactin-1
40	G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase
41	NDRG2	Protein NDRG2
42	PCSK1	ProSAAS
43	SNAB	Beta-soluble NSF attachment protein
44	STX1A	Syntaxin-1A
45	SYPH	Synaptophysin
46	VISL1	Visinin-like protein 1
47	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form
48	AMPH	Amphiphysin
49	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta
50	COR1A	Coronin-1A
51	GPC1	Glypican-1
52	GUAD	Guanine deaminase
53	HEXB	Beta-hexosaminidase subunit beta
54	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a
55	TENR	Tenascin-R
56	ACBP	Acyl-CoA-binding protein
57	CAPG	Macrophage-capping protein
58	KCD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12
59	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
60	EPDR1	Mammalian ependymin-related protein 1
61	GDN	Glia-derived nexin
62	STX7	Syntaxin-7
63	TPPP	Tubulin polymerization-promoting protein
64	TSN7	Tetraspanin-7
65	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
66	PEA15	Astrocytic phosphoprotein PEA-15
67	AT1B2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2
68	GPC4	Glypican-4
69	GPC5	Glypican-5
70	HSP74	Heat shock 70 kDa protein 4
71	LSP1	Lymphocyte-specific protein 1
72	MK	Midkine
73	PDC61	Programmed cell death 6-interacting protein
74	PRIO	Major prion protein
75	PROF2	Profilin-2
76	RAB14	Ras-related protein Rab-14
77	RAB2A	Ras-related protein Rab-2A
78	SDCB1	Syntenin-1
79	SH3G1	Endophilin-A2
80	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1
81	SV2B	Synaptic vesicle glycoprotein 2B
82	TEFF2	Tomoregulin-2
83	THIO	Thioredoxin

Supplementary Data 2. Detected proteins in WT brain vessels

#	Accession	Description
1	ACTA	Actin, aortic smooth muscle
2	PGBM	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
3	MYH11	Myosin-11
4	ACTN4	Alpha-actinin-4
5	TBB4B	Tubulin beta-4B chain
6	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain
7	ACTN1	Alpha-actinin-1
8	FLNA	Filamin-A
9	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial
10	K1C18	Keratin, type I cytoskeletal 18
11	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
12	TPM2	Tropomyosin beta chain
13	TAGL	Transgelin
14	VINC	Vinculin
15	HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta
16	THIM	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial
17	CO4A2	Collagen alpha-2(IV) chain
18	LAMC1	Laminin subunit gamma-1
19	ENPL	Endoplasmic
20	LAMB2	Laminin subunit beta-2
21	SRBS2	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2
22	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain
23	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
24	ADT2	ADP/ATP translocase 2
25	LAMA5	Laminin subunit alpha-5
26	ECHB	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial
27	H3C	Histone H3.3C
28	H2B1B	Histone H2B type 1-B
29	TAGL2	Transgelin-2
30	ECHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
31	ETFB	Electron transfer flavoprotein subunit beta
32	S12A2	Solute carrier family 12 member 2
33	TTHY	Transthyretin
34	GPM6A	Neuronal membrane glycoprotein M6-a
35	COX2	Cytochrome c oxidase subunit 2
36	COX4I	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial
37	B3A2	Anion exchange protein 2
38	IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
39	IVD	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
40	ML12B	Myosin regulatory light chain 12B
41	PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1
42	SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
43	CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain
44	ACADL	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
45	AQP1	Aquaporin-1
46	ATP5H	ATP synthase subunit d, mitochondrial
47	ATPO	ATP synthase subunit O, mitochondrial
48	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
49	MYL9	Myosin regulatory light polypeptide 9
50	RL13	60S ribosomal protein L13
51	RL26	60S ribosomal protein L26
52	RL8	60S ribosomal protein L8
53	RS14	40S ribosomal protein S14
54	RS18	40S ribosomal protein S18
55	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
56	TIN2L	Tubulointerstitial nephritis antigen-like
57	AT2B1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
58	QCR7	Cytochrome b-c1 complex subunit 7
59	ATP5J	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial
60	PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial
61	RL7	60S ribosomal protein L7
62	ATP5I	ATP synthase subunit e, mitochondrial
63	BCAM	Basal cell adhesion molecule
64	CAVN1	Caveolae-associated protein 1
65	CO6A1	Collagen alpha-1(VI) chain
66	CO1A1	Collagen alpha-1(XVIII) chain
67	EF1D	Elongation factor 1-delta
68	GTR1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
69	NB5R3	NADH-cytochrome b5 reductase 3
70	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial
71	NID1	Nidogen-1
72	PRELP	Prolargin
73	PTMA	Prothymosin alpha
74	RET1	Retinol-binding protein 1
75	RL3	60S ribosomal protein L3

Supplementary Data 3. Detected proteins in A β -positive vessels

#	Accession	Description
1	MFG-E8	Lactadherin
2	TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3

Supplementary Data 4. Common proteins between A β plaques and A β vessels

#	Accession	Description
1	APOE	Apolipoprotein E
2	A4	Amyloid-beta A4 protein
3	VTNC	Vitronectin
4	HTRA1	Serine protease HTRA1
5	TICN2	Testican-2
6	C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B

Supplementary Data 5. Common proteins between WT brain vessels and A β vessels

#	Accession	Description
1	ACTA	Actin, aortic smooth muscle
2	PGBM	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
3	MYH11	Myosin-11
4	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain
5	FLNA	Filamin-A
6	TAGL	Transgelin
7	VINC	Vinculin
8	H12	Histone H1.2
9	H14	Histone H1.4
10	H2A2A	Histone H2A type 2-A
11	CO4A2	Collagen alpha-2(IV) chain
12	LAMC1	Laminin subunit gamma-1
13	LAMB2	Laminin subunit beta-2
14	SRBS2	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2
15	LAMA5	Laminin subunit alpha-5
16	HBA	hemoglobin subunit alpha
17	CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain
18	ROA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
19	MYL9	Myosin regulatory light polypeptide 9
20	TINALE	Tubulointerstitial nephritis antigen-like
21	CO4A1	Collagen alpha-1(IV) chain
22	BCAM	Basal cell adhesion molecule
23	CO6A1	Collagen alpha-1(VI) chain
24	CO1A1	Collagen alpha-1(XVIII) chain
25	NID1	Nidogen-1
26	HBB1	Hemoglobin subunit beta-1

Supplementary Data 6. Common proteins between A β plaques and WT brain vessels

#	Accession	Description
1	TBB4B	Tubulin beta-4B chain
2	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1
3	TBA4A	Tubulin alpha-4A chain
4	AT1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
5	GNAO	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
6	HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta
7	SPTN1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
8	CALM1	Calmodulin-1
9	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
10	ACON	Aconitate hydratase
11	HXK1	Hexokinase-1
12	MOES	Moesin
13	MDHC	Moesin
14	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha
15	GPM6A	Neuronal membrane glycoprotein M6-a
16	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
17	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain
18	TPIS_	Triosephosphate isomerase
19	AATM	Aspartate aminotransferase, mitochondrial
20	CLH1	Clathrin heavy chain 1
21	AT1B1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1
22	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial
23	GDIA	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
24	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain
25	VATA	V-type proton ATPase catalytic subunit A
26	TERA	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
27	DHE3	Glutamate dehydrogenase 1
28	ADT1	ADP/ATP translocase 1
29	ARF1	ADP-ribosylation factor 1
30	AT2B1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
31	SAP	Prosaposin
32	EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2
33	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
34	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
35	COF1	Cofilin-1
36	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
37	ENPL	Endoplasmin
38	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha
39	MPCP	Phosphate carrier protein, mitochondrial
40	ANXA5	Annexin A5
41	THIL	Acetyl-CoA acetyltransferase
42	MIF	Macrophage migration inhibitory factor
43	NHRF1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1
44	NDKA	V-type proton ATPase catalytic subunit A
45	ANXA3	Annexin A3
46	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
47	CAH2	Carbonic anhydrase 2
48	TAGL2	Transgelin-2
49	COX2	Cytochrome c oxidase subunit 2
50	COX4I	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1
51	ATPD	ATP synthase subunit delta
52	RTN4	Reticulon-4
53	EFTU	Elongation factor Tu
54	FKB1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A
55	PCP4	Calmodulin regulator protein PCP4
56	PROF1	Profilin-1
57	UBP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5
58	MARCS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
59	TKT	Transketolase
60	DEST	Destrin
61	PLM	Phospholemman
62	SERA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
63	CATB	Cathepsin B
64	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A
65	HINT1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1
66	MTPN	Myotrophin
67	PSB6	Proteasome subunit beta type-6
68	SAHH2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1
69	GSTP1	Glutathione S-transferase P 1

Supplementary Data 7. Common proteins among the three experimental groups

#	Accession	Description
1	CLUS	Clusterin
2	TBB5	Tubulin beta-5 chain
3	TBB2A	Tubulin beta-2A chain
4	GFAP	Glial fibrillary acidic protein
5	AT1A2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2
6	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein
7	KCRB	Creatine kinase B-type
8	VIME	Vimentin
9	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2
10	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
11	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A
12	GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1
13	BASP1	Brain acid soluble protein 1
14	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
15	GLNA	Glutamine synthetase
16	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
17	I433G	14-3-3 protein gamma
18	I433E	14-3-3 protein epsilon
19	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C
20	I433B	14-3-3 protein beta/alpha
21	ENOG	Gamma-enolase
22	PRDX6	Peroxiredoxin-6
23	I433T	14-3-3 protein theta
24	SPTB2	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1
25	MBP	Myelin basic protein
26	I433F	14-3-3 protein eta
27	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
28	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic
29	H2A1B	Histone H2A type 1-B
30	SODC	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
31	H3C	Histone H3.3C
32	H2B1B	Histone H2B type 1-B
33	MYH9	Myosin-9
34	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
35	ACTN1	Alpha-actinin-1
36	GDIR1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1

**Circulating AQP4 Levels in Patients with Cerebral Amyloid
Angiopathy-Associated Intracerebral Hemorrhage**

Journal of Clinical Medicine (2021)

Mar 2; 10, 989. doi: 10.3390/jcm10050989



Article

Circulating AQP4 Levels in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy-Associated Intracerebral Hemorrhage

Paula Marazuela ¹, Anna Bonaterra-Pastra ¹, Júlia Faura ¹, Anna Penalba ¹, Jesús Pizarro ¹, Olalla Pancorbo ², David Rodríguez-Luna ², Carla Vert ³, Alex Rovira ³ , Francesc Pujadas ⁴, M. Mar Freijo ⁵, Silvia Tur ⁶, Maite Martínez-Zabaleta ⁷, Pere Cardona Portela ⁸, Rocío Vera ⁹, Lucia Lebrato-Hernández ¹⁰, Juan F. Arenillas ^{11,12}, Soledad Pérez-Sánchez ¹³ , Joan Montaner ^{1,13,14}, Pilar Delgado ¹ and Mar Hernández-Guillamon ^{1,*}

¹ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain; paula.marazuela@vhir.org (P.M.); anna.bonaterra@vhir.org (A.B.-P.); julia.faura@vhir.org (J.F.); anna.penalba@vhir.org (A.P.); jesus.pizarro@vhir.org (J.P.); joan.montaner@vhir.org (J.M.); pilar.delgado@vhir.org (P.D.)

² Stroke Unit, Department of Neurology, Vall d'Hebron Hospital, 08035 Barcelona, Spain; olallapr@vhir.org (O.P.); rodriguez@vhebron.net (D.R.-L.)

³ Neuroradiology, Department of Radiology, Vall d'Hebron Hospital, 08035 Barcelona, Spain; carla_vert@hotmail.com (C.V.); alex.rovira.idi@gencat.cat (A.R.)

⁴ Dementia Unit, Neurology Department, Vall d'Hebron Hospital, 08035 Barcelona, Spain; fpujadas@vhebron.net

⁵ Neurovascular Group, Biocruces Health Research Institute, 48903 Barakaldo, Spain; mariadelmar.freijoguerrero@osakidetza.net

⁶ Neurology, Son Espases University Hospital, 07120 Balearic Islands, Spain; silvia.tur@ssib.es

⁷ Department of Neurology, Donostia University Hospital, 20080 San Sebastián, Spain; mariateresa.martinez@osakidetza.eus

⁸ Department of Neurology, Bellvitge University Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, 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, 47003 Valladolid, Spain; juanarenillas@gmail.com

¹² Clinical Neurosciences Research Group, Department of Medicine, University of Valladolid, 47003 Valladolid, Spain

¹³ Department of Neurology, Virgen Macarena University Hospital, 41009 Sevilla, Spain; soledad.perez.sanchez@gmail.com

¹⁴ Stroke Research Program, Institute of Biomedicine of Sevilla, IBISe, Virgen del Rocío University Hospital, University of Sevilla, 41009 Sevilla, Spain

* Correspondence: mar.hernandez.guillamon@vhir.org



Citation: Marazuela, P.; Bonaterra-Pastra, A.; Faura, J.; Penalba, A.; Pizarro, J.; Pancorbo, O.; Rodríguez-Luna, D.; Vert, C.; Rovira, A.; Pujadas, F.; et al. Circulating AQP4 Levels in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy-Associated Intracerebral Hemorrhage. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 989. <https://doi.org/10.3390/jcm10050989>

Academic Editor: Peter Sporns

Received: 7 January 2021

Accepted: 22 February 2021

Published: 2 March 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) is a major cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) in elderly patients. Growing evidence suggests a potential role of aquaporin 4 (AQP4) in amyloid-beta-associated diseases, including CAA pathology. Our aim was to investigate the circulating levels of AQP4 in a cohort of patients who had suffered a lobar ICH with a clinical diagnosis of CAA. AQP4 levels were analyzed in the serum of 60 CAA-related ICH patients and 19 non-stroke subjects by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The CAA-ICH cohort was divided according to the time point of the functional outcome evaluation: mid-term (12 ± 18.6 months) and long-term (38.5 ± 32.9 months) after the last ICH. Although no differences were found in AQP4 serum levels between cases and controls, lower levels were found in CAA patients presenting specific hemorrhagic features such as ≥ 2 lobar ICHs and ≥ 5 lobar microbleeds detected by magnetic resonance imaging (MRI). In addition, CAA-related ICH patients who presented a long-term good functional outcome had higher circulating AQP4 levels than subjects with a poor outcome or controls. Our data suggest that AQP4 could potentially predict a long-term functional outcome and may play a protective role after a lobar ICH.

Keywords: aquaporin 4; cerebral amyloid angiopathy; intracerebral hemorrhage; magnetic resonance imaging markers; functional outcome

1. Introduction

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is characterized by the deposition of amyloid in the walls of cerebral blood vessels [1]. The most common form of CAA is associated with the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) peptide in arterioles, capillaries, and leptomeningeal vessels and is frequently found in Alzheimer's disease (AD) patients [2,3]. AD is the most common form of dementia worldwide, whereas CAA is the main cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) [4,5]. ICH recurrence is one of the major complications of CAA, leading to substantial mortality and disability [6]. In addition to symptomatic ICH, transient focal neurological episodes and cognitive impairment independent of AD are also common clinical manifestations of CAA [7,8]. Despite the poor prognosis of CAA-related lobar ICH, no effective treatments are available, and a definitive diagnosis requires histopathologic demonstration by postmortem autopsy [9,10]. However, in clinical practice, the diagnosis of CAA is established following the modified Boston criteria based on clinical data and the presence of specific magnetic resonance imaging (MRI) markers [11]. Lobar cerebral microbleeds, cortical superficial siderosis, enlarged perivascular spaces in the centrum semiovale, and white matter hyperintensities are some of the frequent CAA radiological features detected by MRI [12–15].

Pathologically, $A\beta$ peptides are generated by the sequential processing of amyloid precursor protein (APP) by β -secretase and γ -secretase, resulting in peptides consisting of 40 or 42 amino acids ($A\beta_{40}$ or $A\beta_{42}$, respectively). $A\beta_{42}$ mainly accumulates in neuritic plaques in the brain parenchyma of AD patients, while $A\beta_{40}$ is predominantly deposited on the walls of cerebral vessels, replacing smooth muscle cells and leading to vascular degeneration in CAA [16,17]. Although the cellular pathways explaining $A\beta$ accumulation remain unclear, the most widely accepted theory is based on an imbalance between $A\beta$ production and clearance. Several mechanisms have been described to remove $A\beta$ from the brain, including proteolytic and microglial degradation, active transport across the blood–brain barrier (BBB), and perivascular and lymphatic drainage [17–19]. In fact, several studies have suggested that the perivascular drainage pathway may be impaired in CAA, which would lead to $A\beta$ accumulation in vascular basement membranes [20–22].

Aquaporins are a family of water channel proteins that regulate water transport across cell membranes [23]. Aquaporin 4 (AQP4) is the most abundant water channel of the central nervous system and is mainly expressed by astrocytes and ependymal cells. AQP4 is highly localized to the perivascular astrocytic end-feet surrounding the glial limiting membrane of blood vessels [24,25]. Recent evidence suggests that AQP4 plays an essential role in the clearance of solutes between cerebrospinal fluid (CSF) and interstitial fluid (IF) through perivascular drainage, including $A\beta$ clearance [26,27]. In this regard, several studies have described altered AQP4 expression and localization in AD and CAA patients [28–30]. However, most of these studies are based on postmortem analysis of human brain tissue, and the alteration of plasma AQP4 levels in AD or CAA patients is still unexplored. In the present study, we first aimed to study whether circulating AQP4 could be an indicative biomarker of CAA pathology and whether its determination would thus contribute to the diagnosis and prognosis of this disease. For this purpose, we analyzed the potential association of AQP4 levels with the main neuroimaging hallmarks of CAA in a multicenter cohort of patients with lobar ICH associated with CAA. We next determined the relationship between circulating AQP4 levels and other functional variables in this cohort.

2. Methods

2.1. Study Population

The study cohort consisted of 60 patients who presented with symptomatic ICH with a clinical diagnosis of CAA, as well as 19 age- and sex-matched control subjects. CAA-ICH patients had possible, probable or probable CAA with a supporting pathology diagnosis according to the modified Boston criteria [11]. Controls were healthy participants with no stroke history from the ISSYS (investigating silent strokes in hypertensives, a magnetic resonance imaging study) cohort who underwent brain MRI at a follow-up visit [31]. Controls were chosen for having no hemorrhagic events on their MRI scans. Sixty CAA-ICH patients were recruited in the neurology or stroke units from 10 different Spanish centers. CAA-ICH patients were >55 years old and had suffered at least one lobar ICH. Patients were excluded if they 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. The data obtained from the whole cohort included patient coding, inclusion date, demographic characteristics (age and sex), relevant vascular risk factors (hypertension, diabetes, and dyslipidemia), and brain imaging findings. The clinical and demographic data of both cohorts are shown in Table 1. Blood samples from the CAA-ICH cohort were obtained in a chronic state of the disease (13.6 ± 17.8 months after the last ICH) to avoid capturing the initial inflammatory process. Cognitive impairment was determined at the time of baseline visit (or blood draw) in all patients based on clinical history and neurological examinations. Additionally, functional outcome was assessed using the modified Rankin Scale (mRS) for neurologic disability. For a more detailed analysis, the CAA-ICH cohort was divided into two subcohorts based on the time point of the last functional outcome evaluation. In subcohort 1 ($n = 35$), mid-term outcome was assessed at 12 ± 18.6 months after the last ICH, the same time as when blood was drawn. In subcohort 2 ($n = 25$), blood was collected 15.8 ± 17 months after the last ICH, and long-term outcome was assessed at 34.4 ± 24.8 months after blood collection. A schematic representation describing the time points of recruitment and outcome evaluation for these cohorts is shown in Appendix A Figure A1. Outcomes were dichotomized into good vs. poor: poor outcome was defined as $mRS > 3$, and good outcome was defined as $mRS \leq 3$.

Table 1. Demographic, clinical, and radiological characteristics of the total cohort.

Variable	Control ($n = 19$)	CAA-ICH ($n = 60$)	<i>p</i> -Value
Age, years, median (IQR)	74 (73.5–74)	76.5 (71.5–70)	0.130
Sex, female, <i>n</i> (%)	10 (52.6%)	30 (50%)	1
Hypertension	19 (100%)	29 (48.3%)	0.000
Diabetes	6 (31.3%)	7 (11.7%)	0.063
Dyslipidemia	16 (78.9%)	17 (28.3%)	0.000
APOE genotype, $\epsilon 2$ carriers	1 (5.3%)	8 (13.3%)	0.679
APOE genotype, $\epsilon 4$ carriers	7 (36.8%)	14 (23.3%)	0.251
Lobar ICH	0 (0.0%)	60 (100%)	0.000
WMH, <i>n</i> (%)	9 (47.4%)	57 (95.0%)	0.000
CMB	0 (0.0%)	40 (66.7%)	0.000
Serum AQP4, ng/mL, median (IQR)	2.12 (1.63–2.67)	2.15 (1.44–4.12)	0.626

CAA, cerebral amyloid angiopathy; IQR, interquartile range; APOE, apolipoprotein E; WMH, white matter hyperintensity; ICH, intracerebral hemorrhage; CMB, cerebral microbleed; AQP4, aquaporin 4. *p*-Values below 0.05 are shown in bold.

The study was approved by the Clinical Investigation Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain (PR(AG)326/2014), and had the approval of the ethics committees of all of the participating centers. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients provided signed informed consent before inclusion.

2.2. MRI Protocol and Radiological Data

A brain MRI scan was obtained from all participants (1.5 ± 16.4 months after the last ICH). MRI examinations were acquired using a 1.5-T whole-body scanner system. The images obtained included 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 sequences. All MRI scans were evaluated by the same neuroradiologist at Hospital Vall d'Hebron, who was blinded to the clinical and biological information.

The radiological characteristics of the CAA-ICH cohort obtained through MRI analysis are presented in Table 2. ICHs were defined as hypointense foci on the T2*-weighted images (diameter >5 mm), and their number and location were recorded. The presence, number, and distribution of cerebral microbleeds (CMBs; diameter <5 mm) were evaluated according to the Brain Observer Microbleed Scale [32]. White matter hyperintensities (WMHs) were defined as hyperintense signal lesions in T2-FLAIR or T2*-weighted images. Deep and periventricular WMHs were assessed according to the four-point Fazekas rating scale [33]. This scale scores damage from 0 to 4: (0) Absent or isolated foci of 3 mm, (1) foci of less than 5 mm (periventricular caps not included); (2) foci of more than 5 mm (periventricular caps not included); (3) beginning of confluence; (4) large confluent lesions (larger than 20 mm or two or more lesions merged). Severe WMH was defined as a score of 3 or 4. The WMH score was recorded in the hemisphere not affected by hemorrhage, except in cases when both hemispheres were involved. Perivascular or Virchow–Robin spaces are considered CSF-like signal lesions along the course of penetrating arteries. Enlarged perivascular spaces (EPVS) were counted in the basal ganglia and in the centrum semiovale (CSO) and were classified as moderate (≤ 20 EPVS) or severe (≥ 21 EPVS) according to the number found on axial T2-weighted MRI images [13,34]. Cortical superficial siderosis (cSS) was defined as the deposition of hemosiderin in the subpial layers of the cerebral cortex. The distribution and severity of cSS was categorized as focal (restricted to ≤ 3 sulci) or disseminated (>4 sulci) [11]. cSS contiguous to an ICH was not considered. Total cerebral small vessel disease (SVD) burden defined by Charidimou et al. was assessed using the principal MRI markers of CAA (lobar CMBs, WMH, EPVS, and cSS) [35]. The total SVD burden ranged from 0 to 6 points and was determined by counting the presence and grade of each of these 4 MRI features [35]. In our study, a high SVD burden was defined as a score ≥ 4 .

2.3. Serum AQP4 Determination

Peripheral blood was collected in EDTA tubes, and serum was immediately separated by centrifugation at 1500 g for 15 min and stored at -80 °C. Only blood samples collected during a follow-up visit (at least 1.5 months after ICH) were considered for the analysis. The total AQP4 levels in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the AQP4 Human Kit (Cusabio Biotech., Wuhan, China) following the manufacturer's instructions. Optical density was measured at 450 nm in a Synergy™ Mx microplate reader (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA). All samples were assayed in duplicate, and replicates with a coefficient of variation $>20\%$ were discarded from the statistical analyses.

2.4. Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted with the SPSS 20.0 package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), and graphs were generated in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software,

La Jolla, CA, USA). Descriptive statistics were used to define the demographic data, clinical variables, and radiological characteristics of the CAA-ICH cohort. The normality of the continuous variables was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. For univariate analysis, the Mann–Whitney U-test and the Kruskal–Wallis test were used to evaluate the significant differences in the non-normally distributed variables between groups. Correlations were calculated as Spearman’s rho to compare two continuous variables, and the chi-squared test was used to assess the intergroup differences for the categorical variables. Binary logistic regression analysis was performed for ≥ 2 ICHs and cognitive impairment, including variables significantly associated with each end-point in the univariate analysis. A stepwise forward method was used in order to select those variables that fitted in the model. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean or median values (interquartile range). A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

Table 2. Radiological characteristics of the CAA-ICH cohort.

CAA-ICH ($n = 60$)	
Boston Criteria	
Possible	12 (20.0%)
Probable	45 (75.0%)
Probable with supporting pathology	3 (5.0%)
WMH	57 (95.0%)
Periventricular	51 (85.0%)
Moderate (1–2 Fazekas)	10 (16.7%)
Severe (3–4 Fazekas)	41 (68.3%)
Deep subcortical WMH	52 (86.7%)
Moderate (1–2 Fazekas)	21 (35.0%)
Severe (3–4 Fazekas)	31 (51.6%)
CMB	40 (66.7%)
Lobar CMB	40 (66.7%)
1–5	14 (23.3%)
6–10	9 (15.0%)
10–20	3 (5.0%)
>20	14 (23.3%)
Deep CMB	0 (0.0%)
Cerebellar CMB	4 (6.7%)
EPVS	53 (88.3%)
EPVS basal ganglia	52 (86.7%)
Moderate (1–20)	43 (71.7%)
Severe (21 to >40)	9 (15.0%)
EPVS CSO	41 (68.3%)
Moderate (1–20)	19 (31.7%)
Severe (21 to >40)	22 (36.7%)
cSS	30 (50.0%)
Focal	9 (15.0%)
Disseminated	21 (35.0%)
Atrophy	23 (38.3%)
Small vessel disease burden	
Low (0–3)	22 (36.7%)
High (4–6)	38 (63.3%)

Data are expressed as n (%). WMH, white matter hyperintensity; CMB, cerebral microbleed; EPVS, enlarged perivascular space; CSO, centrum semiovale; cSS, cortical superficial siderosis.

3. Results

3.1. Baseline Characteristics

The demographic, clinical, and radiological characteristics of the 60 CAA-related ICH patients and the 19 healthy control subjects included in the study are described in Table 1. There were no significant differences between the two groups in terms of age, sex, or APOE genotype. The control cohort was selected for not having ICH or detectable cerebral

microbleeds by MRI. Some control subjects did show WMHs in both the periventricular and deep regions, but the prevalence was significantly higher in CAA-related ICH patients. AQP4 was detected in the serum from the control subjects and the CAA patients, although no significant differences were observed between groups.

The main MRI radiological characteristics of the CAA-ICH cohort are summarized in Table 2. All patients with lobar ICH fulfilled the Boston diagnostic criteria of probable or possible CAA. The majority of these patients (66.7%) had at least one lobar CMB, whereas no CMBs in the deep regions were detected. Overall, a high SVD burden score (63.3%), a high prevalence of severe WMH in the periventricular (68.3%) and deep regions (51.6%), a high degree of EPVS-CSO (36.7%), and disseminated cSS (35%) constituted the principal radiological features of the cohort.

3.2. AQP4 Levels According to Clinical and Radiological Characteristics

Circulating levels of AQP4 were evaluated in the CAA-related ICH cohort and analyzed for any correlations with the clinical and radiological characteristics. We determined that lower circulating levels of AQP4 were related to Apoε4 and cognitive impairment in the univariate analysis (Table 3). However, only the presence of WMH in the periventricular areas remained independently associated with cognitive impairment after the adjustment by binary logistic regression analysis (Table A1 and Table 5). On the contrary, patients who had suffered a previous hemorrhagic stroke presented significantly lower levels of AQP4, whereas presenting a previous ischemic stroke did not result in changes in serum AQP4 levels (Table 3).

Table 3. Univariate analysis of AQP4 levels according to CAA-ICH demographic and clinical characteristics.

Variable	YES	NO	<i>p</i> -Value
Age	<i>r</i> = 0.147		0.264
Sex, female	2.19 (1.46–4.20) <i>n</i> = 30	2.08 (1.41–4.04) <i>n</i> = 30	0.684
Hypertension	1.85 (1.45–3.29) <i>n</i> = 29	2.89 (1.77–4.27) <i>n</i> = 28	0.102
Diabetes	2.60 (2.11–3.58) <i>n</i> = 7	2.14 (1.44–4.27) <i>n</i> = 48	0.435
Dyslipidemia	1.81 (1.41–2.89) <i>n</i> = 17	2.11 (1.44–4.41) <i>n</i> = 36	0.331
APOE genotype, ε2 carriers	1.75 (1.18–3.00) <i>n</i> = 8	2.30 (1.45–4.27) <i>n</i> = 52	0.317
APOE genotype, ε4 carriers	1.46 (1.03–2.60) <i>n</i> = 14	2.41 (1.65–4.20) <i>n</i> = 46	0.028
Cognitive impairment	1.69 (1.27–2.76) <i>n</i> = 30	3.09 (1.81–4.38) <i>n</i> = 30	0.030
Previous stroke	1.28 (0.99–1.67) <i>n</i> = 12	2.68 (1.69–4.35) <i>n</i> = 48	0.002
Previous ischemic stroke	1.53 (1.26–3.27) <i>n</i> = 4	2.68 (1.69–4.35) <i>n</i> = 48	0.261
Previous hemorrhagic stroke	1.12 (0.79–1.61) <i>n</i> = 8	2.68 (1.69–4.35) <i>n</i> = 48	0.001

Data are expressed as median nanograms per milliliter (interquartile range). *r*, Spearman's rho correlation, CAA-ICH cohort; *n* = 60. *p*-Values below 0.05 are shown in bold.

The neuroimaging analysis of the CAA-ICH cohort revealed a negative correlation between the number of lobar ICHs and AQP4 serum levels (Table 4). In fact, those patients with ≥2 lobar ICHs had significantly lower levels of AQP4 than those with only one lobar ICH (Figure 1A). After adjustment for significantly associated variables in the univariate

analysis (Table 5), the logistic regression analysis confirmed that serum AQP4 levels, Apoε2 allele, high SVD burden, and atrophy were independent predictors of ≥ 2 lobar ICHs (Table 5). In addition, a tendency ($p = 0.052$) toward lower AQP4 levels in patients presenting lobar CMBs was detected. When this variable was reclassified, serum samples from patients presenting with ≥ 5 CMBs showed lower AQP4 levels (Figure 1B). CAA-ICH patients presenting WMHs in deep regions also had significantly lower levels of AQP4 (Table 4). Remarkably, we did not detect an association between serum AQP4 concentration and the total MRI small vessel disease score validated for a pathological CAA presentation with symptomatic ICH [35].

Table 4. Univariate analysis of AQP4 levels according to CAA-ICH radiological characteristics.

Variable	YES	NO	<i>p</i> -Value
Interval between the last ICH and the date of blood collection	$r = -0.052$		0.703
Number of lobar ICHs	$r = -0.307$		0.017
WMH	2.04 (1.43–3.71) <i>n</i> = 57	4.46 (3.15–5.7) <i>n</i> = 3	0.163
Periventricular	2.02 (1.42–3.69) <i>n</i> = 51	3.29 (1.84–5.02) <i>n</i> = 9	0.092
Deep subcortical WMH	1.88 (1.42–3.67) <i>n</i> = 50	3.41 (2.04–5.19) <i>n</i> = 10	0.045
Lobar CMB	1.83 (1.41–3.79) <i>n</i> = 40	2.84 (1.93–4.25) <i>n</i> = 20	0.052
EPVS	2.26 (1.46–4.04) <i>n</i> = 53	1.81 (1.27–3.78) <i>n</i> = 7	0.718
EPVS basal ganglia	2.30 (1.47–4.12) <i>n</i> = 52	1.63 (1.27–3.78) <i>n</i> = 8	0.521
EPVS CSO	2.45 (1.50–4.36) <i>n</i> = 41	1.84 (1.10–3.00) <i>n</i> = 19	0.144
cSS	2.11 (1.16–4.38) <i>n</i> = 30	2.15 (1.65–2.90) <i>n</i> = 30	0.988
Chronic Infarct	1.53 (1.27–2.02) <i>n</i> = 13	2.52 (1.55–4.19) <i>n</i> = 44	0.146
Atrophy	2.26 (1.43–4.00) <i>n</i> = 23	2.04 (1.50–4.04) <i>n</i> = 37	0.715
High SVD burden (score 4–6)	2.35 (1.27–4.34) <i>n</i> = 23	2.03 (1.81–2.90) <i>n</i> = 37	0.570

Data are expressed as median nanograms per milliliter (interquartile range). *r*, Spearman's rho correlation. CAA-ICH cohort: *n* = 60. ICH, intracerebral hemorrhage; WMH, white matter hyperintensity; CMB, cerebral microbleed; EPVS, enlarged perivascular space; CSO, centrum semiovale; cSS, cortical superficial siderosis; SVD, small vessel disease burden. *p*-Values below 0.05 are shown in bold.

3.3. AQP4 and Functional Outcome

We next studied the association between circulating AQP4 levels and functional outcome in two subcohorts divided according to the evaluation time point (Appendix A Figure A1). A poor outcome was assessed in seven (20%) of the 35 patients from subcohort 1 and in eight (32%) of the 25 patients from subcohort 2. No statistically significant differences were found in the levels of AQP4 between subcohort 1 (1.87 (1.29–3.53) ng/mL) and subcohort 2 (2.38 (1.65–4.38) ng/mL) ($p = 0.165$). Interestingly, we found that AQP4 levels differed among CAA-ICH patients depending on the time when the outcome was assessed. First, in subcohort 1, when patient serum was obtained in parallel to the functional outcome evaluation, AQP4 levels did not differ between patients classified with good and poor outcomes (Figure 2A). In contrast, when the long-term functional outcome was assessed,

those CAA-ICH subjects showing good outcomes presented significantly higher levels of AQP4 than subjects with a poor outcomes and controls (Figure 2B). In subcohort 2, AQP4 was the only variable associated with poor outcome in the univariate analysis (Appendix A Table A2).

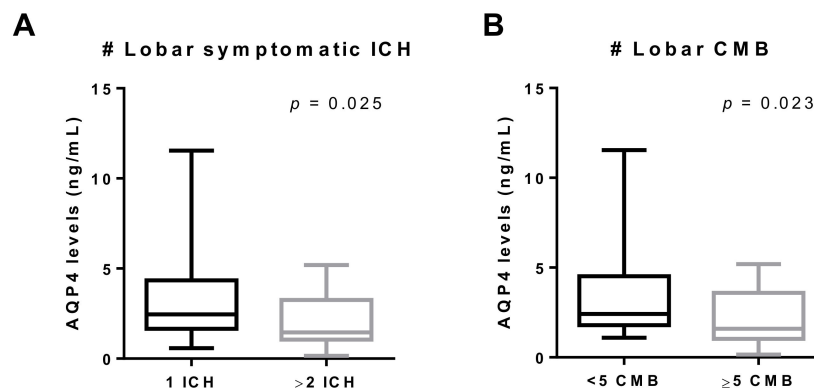


Figure 1. Association between AQP4 levels and hemorrhagic events in the CAA-ICH cohort. (A) Boxplot distribution according to the number of symptomatic ICHs (1 ICH, *n* = 43; ≥2 ICH, *n* = 17). (B) Boxplot distribution according to the number of lobar CMBs (<5 CMB, *n* = 34; ≥5 CMB, *n* = 26). ICH, intracerebral hemorrhage; CMB, cerebral microbleed.

Table 5. Binary logistic regression for cognitive impairment and ≥2 ICHs.

Variable	Regression Cognitive Impairment	Regression ≥ 2 ICHs
	OR (95% CI) <i>p</i> -value	OR (95% CI) <i>p</i> -value
AQP4	-	0.520 (0.286–0.976) <i>p</i> = 0.042
APOE genotype, ε2 carriers	-	22.536 (1.989–255.296) <i>p</i> = 0.034
WMH periventricular	10.545 (1.227–90.662) <i>p</i> = 0.032	-
Atrophy	-	6.167 (1.080–35.213) <i>p</i> = 0.004
High SVD burden (score 4–6)	-	11.280 (1.109–114.739) <i>p</i> = 0.025

Binary logistic regression analysis was performed with variables associated with cognitive impairment and/or ≥2 ICHs in univariate analysis. The results are given as odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) and *p*-values. SVD, small vessel disease. *p*-Values below 0.05 are shown in bold.

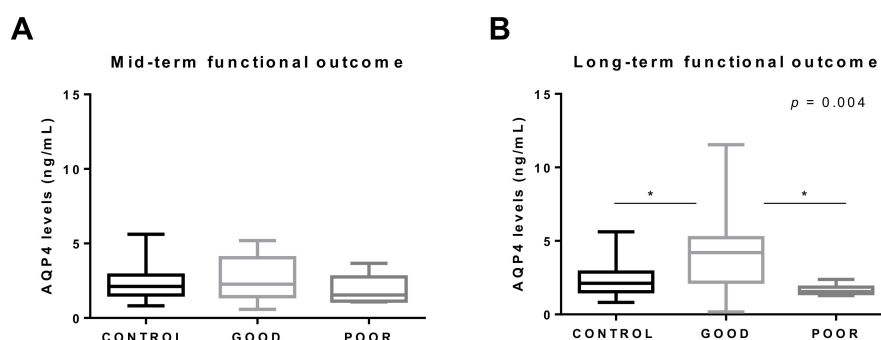


Figure 2. Association between AQP4 levels and functional neurological outcomes in the CAA-ICH cohort. (A) Boxplot distribution between good (*n* = 27) and poor (*n* = 7) mid-term functional outcomes (CAA-ICH subcohort 1) compared to controls (*n* = 19). (B) Boxplot distribution between good (*n* = 17) and poor (*n* = 8) long-term functional outcomes (CAA-ICH subcohort 2) compared to controls (*n* = 19). Outcomes were dichotomized into good vs. poor, and good outcomes were predefined as 0–3 on the modified Rankin Scale for Neurologic Disability. ICH, intracerebral hemorrhage; CMB, cerebral microbleed. * *p* < 0.05.

4. Discussion

In this study, we have shown for the first time the presence of AQP4 in the circulation in CAA-related ICH patients. Although no significant differences were found in circulating AQP4 levels between CAA-ICH patients and controls, an association between serum AQP4 levels and cerebral hemorrhagic load in the CAA cohort was detected. Furthermore, our data revealed that AQP4 could predict the long-term functional outcome in CAA patients after lobar ICH.

Interest in AQP4 research has grown considerably over the last few years. AQP4 is the most highly expressed aquaporin in the brain and is involved in the maintenance of the brain water balance under physiological and pathological conditions [24,29]. Several studies have demonstrated its implication in cerebral edema, ischemic stroke, traumatic brain injury, tumors, and neuromyelitis optica, among others [24,28,35]. Various studies have also found that AQP4 is necessary for the clearance of interstitial solutes, including $A\beta$, through the glymphatic system, suggesting a potential role of AQP4 in the physiopathology of AD and/or CAA [26,36].

To date, the vast majority of studies exploring the role of AQP4 in AD and CAA patients have described an altered distribution of this protein in diseased postmortem brain tissues. Wilcock et al. found reduced AQP4 expression in AD patients with moderate or severe CAA [37]. However, subsequent studies have demonstrated an increase in AQP4 immunoreactivity in AD and CAA brains compared with controls [38–40]. In particular, it was suggested that the AQP4 expression pattern could differ depending on the disease stage, with increased AQP4 immunodetection in CAA cases with the highest AD score [41]. In agreement with that, it has recently been described that the pattern of AQP4 immunodetection is different in gray matter compared to white matter and that it changes with age and with the severity of CAA [42]. Taking all of this into account, AQP4 expression in the brain may be associated with different factors, such as age, CAA severity, and specific neuroanatomical area. However, to the best of our knowledge, no studies have reported the modulation of AQP4 levels in the circulation in AD or CAA.

In this regard, we were able to detect AQP4 in serum from CAA-related ICH patients, although the levels did not differ from those in non-stroke control subjects. In agreement with previous studies [43,44], our results revealed that the presence of WMH in periventricular areas was also independently associated with cognitive impairment in the CAA-ICH cohort. In addition, we found lower circulating levels of AQP4 in patients with cognitive impairment in the univariate analysis. This result is aligned with findings in preclinical models, where behavioral tests revealed a cognitive deficit in AQP4 knockout mice [45–47]. Indeed, studies performed in AD and CAA transgenic mouse models have confirmed that AQP4 deletion promotes cognitive deficits and increases $A\beta$ accumulation and synaptic damage, suggesting a possible contribution of AQP4 to $A\beta$ clearance through the brain vasculature [48]. In contrast to these results, in a recent study conducted in 5xFAD mice, an accelerated model of AD with a lower vascular damage contribution, AQP4 deficiency did not induce alterations in $A\beta$ accumulation or in memory deficit [49]. Nevertheless, experimental evidence suggests that AQP4 may be involved in the clearance of $A\beta$ through perivascular drainage, thus playing a potential protective role in CAA pathology. However, in our study, we did not find an association between circulating AQP4 levels and the global SVD neuroimaging burden score, which has been associated with pathological CAA [35,50]. This result suggests that circulating AQP4 is not an indicative biomarker of CAA pathology. All the same, because AQP4 is related to solute clearance, further research should focus on studying AQP4 protein levels in CSF [26,27].

Remarkably, we found a clear association between serum AQP4 levels and CAA-related hemorrhagic lesions, including symptomatic ICH and CMBs, in the study cohort. Indeed, CAA-ICH patients presenting ≥ 2 ICHs and/or ≥ 5 lobar CMBs had lower levels of AQP4 than those patients without those hemorrhagic events, suggesting a potential protective role of this protein. Moreover, we demonstrated a negative correlation between the number of lobar ICHs and AQP4 serum levels, which is in agreement with other studies

where AQP4 deletion worsened the neurological impairment and promoted neuronal death after ICH [51,52]. Indeed, AQP4 genomic variants were recently found to be independent predictors of the outcome after ICH in different populations [53,54]. Furthermore, we found that circulating AQP4 levels, together with the Apo ϵ 2 allele, atrophy, and high SVD burden variables, were independent predictors of presenting ≥ 2 ICHs. In this line, the Apo ϵ 2 allele is a well-known risk factor for ICH attributed to CAA, predisposing patients to recurrent bleeding [55–57]. Due to the specific localization of AQP4 at the astrocyte end-feet, it has been suggested that AQP4 could play a role in maintaining the BBB integrity [58]. Although most studies seem to point to a protective role for AQP4, it is still controversial whether AQP4 deletion alters the integrity of the BBB after ICH [59–62]. Further studies are needed to confirm the exact function of AQP4 in the brain following ICH, and our findings should be expanded to other cohorts presenting with ICH independently of a CAA etiology.

The present study also revealed that the analysis of serum AQP4 could potentially predict a long-term functional outcome in CAA–ICH patients. Our results showed that patients with a good long-term functional outcome presented higher circulating levels of AQP4 than patients with poor outcomes or healthy controls. In this area, we are aware of only one study that analyzed the levels of AQP4 in the circulation in neurological disorders, reporting higher levels of AQP4 in ischemic stroke patients after the acute phase of the disease [63]. Furthermore, in this same study, AQP4 was found to be an independent predictor of good neurological outcome in stroke patients, which is in agreement with our results [63]. Overall, the increase in circulating AQP4 levels in CAA–ICH patients presenting good long-term outcome and the decreased AQP4 levels in patients with a higher cerebral hemorrhagic load provide suggestive evidence of the potentially protective role of AQP4 after ICH.

Our study has some limitations. First, the sample size was relatively small, which could mask some associations not detectable after multiple testing corrections. Other limitations include the cross-sectional design of the study and the differences in the time points of the recruitment and functional outcome evaluation after the hemorrhagic episode. For this last reason, we decided to divide the total cohort into two subgroups, reducing the sample size even more. Taking all of this into consideration, further research should focus on larger patient cohorts with functional evaluation at different time points to explore whether our findings could be useful for the clinical prediction of long-term functional outcome in ICH patients. It would also be interesting to study the temporal profile of AQP4, as well as to evaluate the association between circulating AQP4 levels and the progression of neuroimaging markers with a follow-up blood draw and an MRI examination at different time points.

5. Conclusions

This study demonstrated, for the first time, that AQP4 can be detected in serum samples from CAA-related lobar ICH patients. Our data showed an association between circulating AQP4 levels and specific hemorrhagic neuroimaging features. In particular, we observed a decrease in AQP4 levels in patients presenting with more than two symptomatic lobar ICHs and in patients with more than five lobar CMBs detected by MRI. These findings suggest that AQP4 could play a protective role in CAA patients after ICH, potentially preserving BBB functionality, which could provide a possible therapeutic target for this pathology. Furthermore, because we found that circulating AQP4 levels were higher in those patients presenting a good long-term outcome, analysis of this serum biomarker might be considered an interesting candidate to be further investigated to improve the accuracy of the outcome prognosis in patients presenting with lobar ICH.

Author Contributions: Conceptualization, M.H.-G. and J.M.; methodology, P.M., A.B.-P., J.F., A.P., and J.P.; 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., J.M., and P.D.; radiological data analysis, C.V. and A.R.; formal analysis, P.M. and M.H.-G.; writing—original draft preparation, P.M. and M.H.-G.; writing—review and editing, P.M., M.H.-G.,

and P.D.; supervision, M.H.-G.; funding acquisition, M.H.-G. All authors read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), (PI17/00275 and PI20/00465), co-financed by the European Regional Development Fund FEDER. The Neurovascular Research Laboratory is part of the INVICTUS+ network, ISCIII, Spain (RD16/0019/0021). M.H.-G. was supported by the Miguel Servet programme, ISCIII, Spain (CPII17/00010). P.M. held a predoctoral fellowship from the Vall d’Hebron Research Institute.

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

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

Data Availability Statement: The data that support this study are available on request from the corresponding author, M.H.-G.

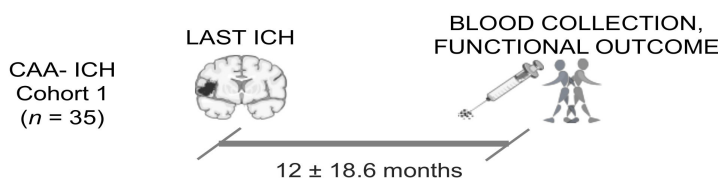
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

A

	Subcohort 1 (n = 35)	Subcohort 2 (n = 25)
Interval between the last ICH and functional outcome evaluation (months)	12.3 ± 18.6	38.5 ± 32.9
Interval between blood collection and functional outcome evaluation (months)	0	34.4 ± 24.8

B



C

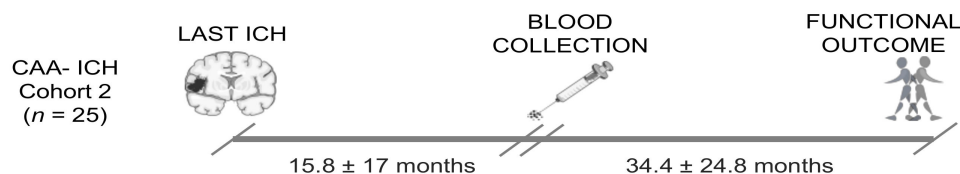


Figure A1. Schematic representation of the cerebral amyloid angiopathy (CAA)–intracerebral hemorrhage (ICH) cohort according to the functional outcome evaluation time point. **(A)** Summary table of the time intervals in the two subcohorts. **(B)** CAA–ICH subcohort 1 refers to individuals whose functional outcome was assessed at the blood collection date, 12 ± 18.6 months after the last ICH (mid-term outcome). **(C)** CAA–ICH subcohort 2 refers to individuals in which functional outcome was assessed 34.4 ± 24.8 months after the blood collection date (long-term outcome). Months are expressed as mean ± SD (standard deviation). Parts of this figure were supported by Servier Medical Art with permission under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Table A1. Univariate analysis of the variables associated with cognitive impairment and ≥ 2 ICHs.

Variable	Cognitive impairment			≥ 2 ICHs		
	YES	NO	<i>p</i> -value	YES	NO	<i>p</i> -Value
AQP4	1.69 (1.27–2.76) <i>n</i> = 30	3.09 (1.81–4.38) <i>n</i> = 30	0.030	1.45 (1.08–3.22) <i>n</i> = 17	2.45 (1.69–4.27) <i>n</i> = 43	0.026
Age	77 (73–79)	74 (69–79)	0.406	77 (72–78)	76 (71.5–79)	0.941
Sex, female	18 (60.0%)	12 (40.0%)	0.196	10 (58.8%)	20 (46.5%)	0.567
Hypertension	15 (53.6%)	14 (48.3%)	0.793	10 (66.7%)	19 (45.2%)	0.230
Diabetes	4 (14.3%)	3 (11.1%)	1	2 (14.3%)	5 (12.2%)	1
Dyslipidemia	8 (29.6%)	9 (34.6%)	0.773	8 (53.3%)	9 (23.7%)	0.053
APOE genotype, $\epsilon 2$ carriers	4 (13.3%)	4 (13.3%)	1	5 (29.4%)	3 (7.0%)	0.035
APOE genotype, $\epsilon 4$ carriers	10 (33.3%)	4 (13.3%)	0.125	6 (35.3%)	8 (18.6%)	0.190
Cognitive impairment	-	-	-	9 (52.9%)	21 (48.8%)	1
≥ 2 lobar ICHs	9 (30.0%)	8 (26.7%)	1	-	-	-
WMH	29 (96.7%)	28 (93.3%)	1	17 (100%)	40 (93.0%)	0.551
Periventricular	29 (96.7%)	22 (73.3%)	0.026	14 (82.4%)	37 (86.05%)	0.704
Deep subcortical WMH	28 (93.3%)	22 (73.3%)	0.080	15 (88.2%)	35 (81.4)	0.709
Lobar CMB	21 (70.0%)	19 (63.3%)	0.785	13 (76.5%)	27 (62.8%)	0.375
EPVS	25 (83.3%)	28 (93.3%)	0.424	13 (76.5%)	40 (93.0%)	0.092
EPVS basal ganglia	25 (83.3%)	27 (90.0%)	0.706	12 (70.6%)	40 (93.0%)	0.035
EPVS CSO	19 (63.3%)	22 (73.3%)	0.580	11 (64.7%)	30 (69.8%)	0.763
cSS	18 (60.0%)	12 (40.0%)	0.196	13 (76.5%)	17 (39.5%)	0.020
Chronic infarct	10 (33.3%)	3 (11.1%)	0.061	5 (33.3%)	8 (19.0%)	0.294
Atrophy	13 (43.3%)	10 (33.3%)	0.596	12 (70.6%)	11 (25.6%)	0.003
High SVD burden (score 4–6)	21 (55.53%)	17 (44.7%)	0.422	15 (88.2%)	23 (53.5%)	0.017

AQP4, aquaporin 4; ICH, intracerebral hemorrhage; APOE, apolipoprotein E; WMH, white matter hyperintensity; CMB, cerebral microbleed; EPVS, enlarged perivascular space; CSO, centrum semiovale; cSS, cortical superficial siderosis; SVD, small vessel disease. *p*-Values below 0.05 are shown in bold.

Table A2. Univariate analysis for long-term functional outcome in subcohort 2.

Variable	CAA-ICH subcohort 2 (<i>n</i> = 25)		<i>p</i> -Value
	Poor outcome	Good outcome	
AQP4	1.56 (1.42–1.81) <i>n</i> = 8	4.20 (2.33–4.89) <i>n</i> = 17	0.002
Age	77 (74.5–81)	77 (72–79)	0.549
Sex, female	6 (75.0%)	9 (52.9%)	0.294
Hypertension	3 (42.9%)	11 (64.7%)	0.324
Diabetes	1 (14.3%)	4 (25.7%)	0.519
Dyslipidemia	2 (25.0%)	1 (7.7%)	0.271
APOE genotype, $\epsilon 2$ carriers	1 (12.5%)	2 (11.8%)	0.958
APOE genotype, $\epsilon 4$ carriers	2 (25.0%)	3 (17.5%)	0.668
Cognitive impairment	6 (75%)	6 (35.3%)	0.064
≥ 2 lobar ICHs	3 (37.5%)	3 (17.6%)	0.278
WMH	8 (100%)	16 (94.1%)	0.484

Table A2. Cont.

CAA-ICH subcohort 2 (n = 25)			
Variable	Poor outcome	Good outcome	p-Value
Periventricular	8 (100%)	13 (76.5%)	0.134
Deep subcortical WMH	8 (100%)	12 (70.6%)	0.086
Lobar CMB	7 (87.5%)	10 (58.8%)	0.152
EPVS	8 (100%)	17 (100%)	-
EPVS basal ganglia	7 (87.5%)	17 (100%)	0.137
EPVS CSO	8 (100%)	15 (88.2%)	0.312
cSS	3 (37.5%)	9 (52.9%)	0.471
Chronic Infarct	3 (42.9%)	2 (11.8%)	0.088
Atrophy	3 (37.5%)	6 (35.3%)	0.915
High SVD burden (score 4–6)	4 (50.0%)	10 (58.8%)	0.678

AQP4, aquaporin 4; ICH, intracerebral hemorrhage; WMH, white matter hyperintensity; CMB, cerebral microbleed; EPVS, enlarged perivascular space; CSO, centrum semiovale; cSS, cortical superficial siderosis; SVD, small vessel disease. p-Values below 0.05 are shown in bold.

References

- Vinters, H.V. Cerebral amyloid angiopathy a critical review. *Stroke* **1987**. [[CrossRef](#)]
- Weller, R.O.; Preston, S.D.; Subash, M.; Carare, R.O. Cerebral amyloid angiopathy in the aetiology and immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **2009**, *1*, 6. [[CrossRef](#)]
- Viswanathan, A.; Greenberg, S.M. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann. Neurol.* **2011**, *70*, 871–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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](#)]
- Vinters, H.V. Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hanger, H.C.; Wilkinson, T.J.; Fayed-Iskander, N.; Sainsbury, R. The risk of recurrent stroke after intracerebral haemorrhage. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2007**, *78*, 836–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Charidimou, A.; Peeters, A.; Fox, Z.; Gregoire, S.M.; Vandermeeren, Y.; Laloux, P.; Jäger, H.R.; Baron, J.-C.; Werring, D.J. Spectrum of Transient Focal Neurological Episodes in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke* **2012**, *43*, 2324–2330. [[CrossRef](#)]
- 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**. [[CrossRef](#)]
- 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](#)]
- Greenberg, S.M.; Charidimou, A. Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke* **2018**, *49*, 491–497. [[CrossRef](#)]
- Linn, J.; Halpin, A.; Demaerel, P.; Ruhland, J.; Giese, A.D.; Dichgans, M.; Van Buchem, M.A.; Bruckmann, H.; Greenberg, S.M. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* **2010**, *74*, 1346–1350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Charidimou, A.; Shakeshaft, C.; Werring, D.J. Cerebral microbleeds on magnetic resonance imaging and anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage risk. *Front. Neurol.* **2012**, *3*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Doubal, F.N.; MacLulich, A.M.J.; Ferguson, K.J.; Dennis, M.S.; Wardlaw, J.M. Enlarged Perivascular Spaces on MRI Are a Feature of Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke* **2010**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhu, Y.-C.; Chabriat, H.; Godin, O.; Dufouil, C.; Rosand, J.; Greenberg, S.M.; Smith, E.E.; Tzourio, C.; Viswanathan, A. Distribution of white matter hyperintensity in cerebral hemorrhage and healthy aging. *J. Neurol.* **2012**, *259*, 530–536. [[CrossRef](#)]
- Charidimou, A.; Meegahage, R.; Fox, Z.; Peeters, A.; Vandermeeren, Y.; Laloux, P.; Baron, J.C.; Jäger, H.R.; Werring, D.J. Enlarged perivascular spaces as a marker of underlying arteriopathy in intracerebral haemorrhage: A multicentre MRI cohort study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2013**. [[CrossRef](#)]
- 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](#)] [[PubMed](#)]
- Gatti, L.; Tinelli, F.; Scelzo, E.; Arioli, F.; Di Fede, G.; Obici, L.; Pantoni, L.; Giaccone, G.; Caroppo, P.; Parati, E.A.; et al. Understanding the pathophysiology of cerebral amyloid angiopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *10*, 3435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Tarasoff-Conway, J.M.; Carare, R.O.; Osorio, R.S.; Glodzik, L.; Butler, T.; Fieremans, E.; Axel, L.; Rusinek, H.; Nicholson, C.; Zlokovic, B.V.; et al. Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2015**, *11*, 457–470. [[CrossRef](#)]
19. Bakker, E.N.T.P.; Bacscai, B.J.; Arbel-Ornath, M.; Aldea, R.; Bedussi, B.; Morris, A.W.J.; Weller, R.O.; Carare, R.O. Lymphatic Clearance of the Brain: Perivascular, Paravascular and Significance for Neurodegenerative Diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2016**, *36*, 181–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Saito, S.; Ihara, M. New therapeutic approaches for Alzheimer’s disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 1–11. [[CrossRef](#)]
21. Weller, R.O.; Subash, M.; Preston, S.D.; Mazanti, I.; Carare, R.O. SYMPOSIUM: Clearance of A β from the Brain in Alzheimer’s Disease: Perivascular Drainage of Amyloid- β Peptides from the Brain and Its Failure in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer’s Disease. *Brain Pathol.* **2007**, *18*, 253–266. [[CrossRef](#)]
22. Hawkes, C.A.; Jayakody, N.; Johnston, D.A.; Bechmann, I.; Carare, R.O. Failure of Perivascular Drainage of β -amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Brain Pathol.* **2014**, *24*, 396–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Day, R.E.; Kitchen, P.; Owen, D.S.; Bland, C.; Marshall, L.; Conner, A.C.; Bill, R.M.; Conner, M.T. Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 1492–1506. [[CrossRef](#)]
24. Papadopoulos, M.C.; Verkman, A.S. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 265–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mader, S.; Brimberg, L. Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. *Cells* **2019**, *2*, 90. [[CrossRef](#)]
26. Abbott, N.J.; Pizzo, M.E.; Preston, J.E.; Janigro, D.; Thorne, R.G. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: Is there a ‘glymphatic’ system? *Acta Neuropathol.* **2018**, *135*, 387–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rasmussen, M.K.; Mestre, H.; Nedergaard, M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 1016–1024. [[CrossRef](#)]
28. Lan, Y.-L.; Zhao, J.; Ma, T.; Li, S. The Potential Roles of Aquaporin 4 in Alzheimer’s Disease. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 5300–5309. [[CrossRef](#)]
29. Chu, H.; Huang, C.; Ding, H.; Dong, J.; Gao, Z.; Yang, X.; Tang, Y.; Dong, Q. Aquaporin-4 and cerebrovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *8*, 1249. [[CrossRef](#)]
30. Yang, C.; Huang, X.; Huang, X.; Mai, H.; Li, J.; Jiang, T.; Wang, X.; Lü, T. Aquaporin-4 and Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* **2016**, *52*, 391–402. [[CrossRef](#)]
31. Riba-Llena, I.; Jarca, C.I.; Mundet, X.; Tovar, J.L.; Orfila, F.; López-Rueda, A.; Nafria, C.; Fernández, J.L.; Castañé, X.; Domingo, M.; et al. Investigating silent strokes in hypertensives: A magnetic resonance imaging study (ISSYS): Rationale and protocol design. *BMC Neurol.* **2013**, *13*, 130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cordonnier, C.; Potter, G.M.; Jackson, C.A.; Doubal, F.; Keir, S.; Sudlow, C.L.M.; Wardlaw, J.M.; Salman, R.A.-S. Improving Interrater Agreement About Brain Microbleeds. *Stroke* **2009**, *40*, 94–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fazekas, F.; Chawluk, J.B.; Alavi, A.; Hurtig, H.I.; Zimmerman, R.A. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer’s dementia and normal aging. *Am. J. Roentgenol.* **1987**. [[CrossRef](#)]
34. Wardlaw, J.M.; Smith, E.E.; Biessels, G.J.; Cordonnier, C.; Fazekas, F.; Frayne, R.; Lindley, R.I.; O’Brien, J.T.; Barkhof, F.; Benavente, O.R.; et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 822–838. [[CrossRef](#)]
35. 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.* **2016**, *73*, 994–1001. [[CrossRef](#)]
36. Rosu, G.C.; Catalin, B.; Balseanu, T.A.; Laurentiu, M.; Claudiu, M.; Kumar-Singh, S.; Daniel, P. Inhibition of Aquaporin 4 Decreases Amyloid A β 40 Drainage Around Cerebral Vessels. *Mol. Neurobiol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
37. Wilcock, D.M.; Vitek, M.P.; Colton, C.A. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer’s disease. *Neuroscience* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Moftakhar, P.; Lynch, M.D.; Pomakian, J.L.; Vinters, H.V. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2010**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hoshi, A.; Tsunoda, A.; Yamamoto, T.; Tada, M.; Kakita, A.; Ugawa, Y. Altered expression of glutamate transporter-1 and water channel protein aquaporin-4 in human temporal cortex with Alzheimer’s disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Boespflug, E.L.; Simon, M.J.; Leonard, E.; Grafe, M.; Woltjer, R.; Silbert, L.C.; Kaye, J.A.; Iliff, J.J. Targeted Assessment of Enlargement of the Perivascular Space in Alzheimer’s Disease and Vascular Dementia Subtypes Implicates Astroglial Involvement Specific to Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* **2018**. [[CrossRef](#)]
41. Hoshi, A.; Yamamoto, T.; Shimizu, K.; Ugawa, Y.; Nishizawa, M.; Takahashi, H.; Kakita, A. Characteristics of Aquaporin Expression Surrounding Senile Plaques and Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2012**, *71*, 750–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Owasil, R.; O'Neill, R.; Keable, A.; Nimmo, J.; Sharp, M.M.; Kelly, L.; Saito, S.; Simpson, J.E.; Weller, R.O.; Smith, C.; et al. The pattern of AQP4 expression in the ageing human brain and in cerebral amyloid angiopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *4*, 1225. [[CrossRef](#)]
43. Debette, S.; Markus, H.S. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2010**, *341*, c3666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mortamais, M.; Artero, S.; Ritchie, K. White Matter Hyperintensities as Early and Independent Predictors of Alzheimer's Disease Risk. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *42*, S393–S400. [[CrossRef](#)]
45. Fan, Y.; Liu, M.; Wu, X.; Wang, F.; Ding, J.; Chen, J.; Hu, G. Aquaporin-4 promotes memory consolidation in Morris water maze. *Brain Struct. Funct.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Skucas, V.A.; Mathews, I.B.; Yang, J.; Cheng, Q.; Treister, A.; Duffy, A.M.; Verkman, A.S.; Hempstead, B.L.; Wood, M.A.; Binder, D.K.; et al. Impairment of select forms of spatial memory and neurotrophin-dependent synaptic plasticity by deletion of glial aquaporin-4. *J. Neurosci.* **2011**. [[CrossRef](#)]
47. Zhang, J.; Li, Y.; Chen, Z.G.; Dang, H.; Ding, J.H.; Fan, Y.; Hu, G. Glia protein aquaporin-4 regulates aversive motivation of spatial memory in morris water maze. *CNS Neurosci. Ther.* **2013**. [[CrossRef](#)]
48. Xu, Z.; Xiao, N.; Chen, Y.; Huang, H.; Marshall, C.; Gao, J.; Cai, Z.; Wu, T.; Hu, G.; Xiao, M. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits. *Mol. Neurodegener.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Abe, Y.; Ikegawa, N.; Yoshida, K.; Muramatsu, K.; Hattori, S.; Kawai, K.; Murakami, M.; Tanaka, T.; Goda, W.; Goto, M.; et al. Behavioral and electrophysiological evidence for a neuroprotective role of aquaporin-4 in the 5xFAD transgenic mice model. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Boulouis, G.; Charidimou, A.; Pasi, M.; Roongpiboonsopit, D.; Xiong, L.; Auriel, E.; van Etten, E.S.; Martinez-Ramirez, S.; Ayres, A.; Vashkevich, A.; 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**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Tang, Y.; Wu, P.; Su, J.; Xiang, J.; Cai, D.; Dong, Q. Effects of Aquaporin-4 on edema formation following intracerebral hemorrhage. *Exp. Neurol.* **2010**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chu, H.; Xiang, J.; Wu, P.; Su, J.; Ding, H.; Tang, Y.; Dong, Q. The role of aquaporin 4 in apoptosis after intracerebral hemorrhage. *J. Neuroinflammation* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Appelboom, G.; Bruce, S.; Duren, A.; Piazza, M.; Monahan, A.; Christophe, B.; Zoller, S.; LoPresti, M.; Connolly, E.S. Aquaporin-4 gene variant independently associated with oedema after intracerebral haemorrhage. *Neurol. Res.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dardiotis, E.; Siokas, V.; Marogianni, C.; Aloizou, A.M.; Sokratous, M.; Paterakis, K.; Dardioti, M.; Grigoriadis, S.; Brotis, A.; Kapsalaki, E.; et al. AQP4 tag SNPs in patients with intracerebral hemorrhage in Greek and Polish population. *Neurosci. Lett.* **2019**. [[CrossRef](#)]
55. O'Donnell, H.C.; Rosand, J.; Knudsen, K.A.; Furie, K.L.; Segal, A.Z.; Chiu, R.I.; Ikeda, D.; Greenberg, S.M. Apolipoprotein E Genotype and the Risk of Recurrent Lobar Intracerebral Hemorrhage. *N. Engl. J. Med.* **2000**. [[CrossRef](#)]
56. Brouwers, H.B.; Biffi, A.; McNamara, K.A.; Ayres, A.M.; Valant, V.; Schwab, K.; Romero, J.M.; Viswanathan, A.; Greenberg, S.M.; Rosand, J.; et al. Apolipoprotein e genotype is associated with ct angiography spot sign in lobar intracerebral hemorrhage. *Stroke* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Nicoll, J.A.R.; McCarron, M.O. APOE gene polymorphism as a risk factor for cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *Amyloid* **2001**, *8*, 51–55. [[PubMed](#)]
58. Nicchia, G.P.; Nico, B.; Camassa, L.M.A.; Mola, M.G.; Loh, N.; Dermietzel, R.; Spray, D.C.; Svelto, M.; Frigeri, A. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: Studies in animal and cell culture models. *Neuroscience* **2004**. [[CrossRef](#)]
59. Saadoun, S.; Tait, M.J.; Reza, A.; Davies, D.C.; Bell, B.A.; Verkman, A.S.; Papadopoulos, M.C. AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience* **2009**. [[CrossRef](#)]
60. Chu, H.; Tang, Y.; Dong, Q. Protection of granulocyte-colony stimulating factor to hemorrhagic brain injuries and its involved mechanisms: Effects of vascular endothelial growth factor and aquaporin-4. *Neuroscience* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Zhou, J.; Kong, H.; Hua, X.; Xiao, M.; Ding, J.; Hu, G. Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport* **2008**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Nico, B.; Frigeri, A.; Nicchia, G.P.; Quondamatteo, F.; Herken, R.; Errede, M.; Ribatti, D.; Svelto, M.; Roncali, L. Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J. Cell Sci.* **2001**, *129*, 935–945.
63. Ramiro, L.; Simats, A.; Penalba, A.; Garcia-Tornel, A.; Rovira, A.; Mancha, F.; Bustamante, A.; Montaner, J. Circulating Aquaporin-4 as A biomarker of early neurological improvement in stroke patients: A pilot study. *Neurosci. Lett.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

DISCUSIÓN

Hasta la fecha, no se conocen tratamientos eficaces que puedan combatir de manera específica la AAC. De hecho, el manejo de la HIC asociada a AAC se basa en medidas preventivas para intentar minimizar el impacto clínico de la HIC y evitar así la recurrencia de los eventos hemorrágicos, tal y como se describe en las guías de práctica clínica para el manejo cualquier tipo de HIC espontánea¹. Desafortunadamente, el diagnóstico definitivo de AAC requiere de confirmación neuropatológica, lo que complica aún más el manejo de estos pacientes en la práctica clínica. No obstante, los criterios de Boston, entre los que se incluye la presencia de una o más HIC lobares y/o microhemorragias de localización exclusivamente lobar, son los que se utilizan actualmente para el diagnóstico no invasivo de AAC en el ámbito clínico². A pesar de su gran utilidad, la realidad es que han mostrado una sensibilidad limitada, por lo que la validación de estos marcadores en cohortes mayores, así como la búsqueda de nuevos candidatos en el campo de la AAC supone una prioridad para poder mejorar el pronóstico de estos pacientes tras un primer evento hemorrágico y poder monitorizar de una forma más precisa los futuros tratamientos para esta enfermedad.

En este contexto, aunque los depósitos de A β en la vasculatura cerebral se pueden detectar *in vivo* con trazadores de amiloide por PET³, hasta el momento, no existen ligandos lo suficientemente específicos que nos permitan diferenciar patologías con componentes moleculares tan solapados como son la AAC y la EA, dificultando aún más el diagnóstico diferencial entre ambas enfermedades. En particular, evidencias clínicas y experimentales sugieren que el fracaso de las terapias anti-A β en el ámbito de la EA podría deberse, entre otros motivos, a la aparición de ARIA como consecuencia de un depósito excesivo de A β en los vasos cerebrales tras la inmunoterapia⁴⁻⁷. Esto resalta la urgente necesidad de encontrar nuevos marcadores en el campo de la β -amiloidosis cerebral que nos permitan, entre otras cosas, estratificar los sujetos en los ensayos clínicos y futuras terapias. En este sentido, si tuviéramos marcadores específicos de AAC, sería interesante analizar el impacto de la aparición de ARIA en el subgrupo con AAC en ensayos clínicos de EA. Teniendo en cuenta todo lo anterior, gran parte de esta tesis doctoral se ha centrado en la búsqueda de nuevos marcadores asociados al depósito amiloide en vasos cerebrales. El hecho de encontrar nuevas moléculas implicadas en la patología de AAC, no sólo nos ayudaría a comprender los mecanismos patológicos subyacentes al depósito vascular de A β , sino que podría contribuir al

desarrollo de nuevas terapias modificadoras de la enfermedad y a realizar un diagnóstico más preciso y diferencial.

1. Importancia de la caracterización de los modelos animales

El desarrollo de modelos animales que mimetizan los rasgos patológicos de la EA y AAC ha sido clave para el avance en el conocimiento de los mecanismos subyacentes que engloban estas patologías y para evaluar los efectos de los posibles candidatos terapéuticos a nivel preclínico. El conocimiento exhaustivo de la progresión del depósito de A β en los distintos modelos animales disponibles de β -amiloidosis cerebral es imprescindible para seleccionar el modelo que mejor se ajuste al objetivo de cada estudio. Además, entender el impacto de factores de riesgo como la edad o el sexo, y la contribución de la disfunción vascular en estos modelos, podría conducir a esclarecer los mecanismos de depósito de A β en diferentes localizaciones en el cerebro.

Por ello, el primer objetivo de esta tesis doctoral se basó en evaluar algunas de las consecuencias neuropatológicas de la deposición de A β en los modelos de ratones transgénicos APP23 y 5xFAD con el mismo fondo genético (C57BL6/J), usados rutinariamente en nuestro laboratorio, en términos de edad y sexo. Los ratones APP23 sobreexpresan la isoforma humana PPA751 conteniendo una mutación familiar asociada a la EA, la doble mutación sueca (K670N/M671L), representando así una forma de EA familiar⁸. En este sentido, seleccionamos el modelo APP23 debido a su contribución previa en el estudio de la patología cerebrovascular asociada al depósito de A β ⁹⁻¹¹. Por el contrario, los ratones 5xFAD se seleccionaron por ser considerados un modelo muy común en el estudio de la EA debido al desarrollo temprano de placas amiloides en el parénquima cerebral^{12,13}. A diferencia del modelo APP23, estos ratones constituyen un modelo doble transgénico, sobreexpresando la isoforma humana PPA691 con tres mutaciones (K670N/M671L, I716V y V717I) y la PS1 humana con dos mutaciones más (M146L y L286V)¹⁴. Sin embargo, es importante tener en cuenta que aunque el modelo 5xFAD recapitula las principales características asociadas con la patología amiloide en la EA, no se han descrito formas familiares de EA humana que se expliquen por múltiples mutaciones simultáneas. Por lo tanto, aunque este modelo ha proporcionado información muy útil sobre la patogénesis de la EA, se debe realizar una interpretación rigurosa de los resultados antes de su traslación a estudios humanos.

1.1 Influencia del sexo y genotipo la supervivencia de los animales

Como primer paso para evaluar la influencia del sexo y genotipo en ambos modelos animales, analizamos la supervivencia de los ratones APP23 y 5xFAD de nuestra colonia. En ambos modelos observamos un aumento en la mortalidad dependiente del genotipo, con una mayor esperanza de vida en los ratones APP23 en comparación con los 5xFAD. De hecho, mientras que los ratones APP23 alcanzaron los 24 meses de edad, los ratones 5xFAD mostraron una elevada mortalidad a partir de los 18 meses. En este sentido, la acumulación exacerbada de depósitos parenquimatosos en el modelo 5xFAD y el inicio temprano de la patología, junto con los graves déficits funcionales y cognitivos observados en estos ratones¹³, podrían explicar las diferencias observadas entre los dos modelos. Estas diferencias podrían venir dadas por la presencia de las cinco mutaciones familiares en los ratones 5xFAD en comparación con la doble mutación presente en el modelo APP23. En cuanto al efecto del sexo, solo observamos diferencias en los ratones APP23, mostrando las hembras un mayor riesgo de mortalidad que los machos. Estudios previos con otros modelos transgénicos de EA, como los ratones APP/PS1, también apuntaron a una mayor esperanza de vida en los machos¹⁵, sin embargo, existe controversia al respecto, ya que los mismos ratones con un fondo genético diferente (C57BL/6:C3H) no mostraron diferencias entre sexos¹⁶. Por otro lado, en modelos transgénicos como el Tg2576 o 3xTg-AD se ha reportado mayor esperanza de vida en hembras que en machos^{16,17}.

Todo ello dificulta la traslación de estos resultados a humanos, por lo que consideramos que futuros estudios deberán demostrar si los mecanismos que explican estas diferencias en la supervivencia de los ratones indican un fenotipo específico de EA modulado por el sexo, o, si por el contrario, estas diferencias son inducidas por determinados mecanismos asociados al envejecimiento, o si incluso están modulados por otros factores como puede ser el fondo genético de las diferentes cepas. En cualquier caso, conocer la supervivencia de las colonias es fundamental para poder hacer diseños experimentales realistas, especialmente en estudios asociados al envejecimiento donde la edad es un factor limitante.

1.2 Evolución del depósito β -amiloide parenquimatoso y su relación con el genotipo y el sexo

En este primer estudio también confirmamos el aumento progresivo de la patología parenquimatosa de A β con la edad en ambos modelos, detectando las primeras placas neuríticas a los 4 meses de edad en los ratones 5xFAD y a los 8 meses en los APP23. En línea con estudios previos, validamos la patología exacerbada en el modelo 5xFAD en comparación con el APP23, aunque hay que destacar que el tamaño de los depósitos fue considerablemente más pequeño en los ratones 5xFAD^{13,14}. En este contexto, observamos una mayor carga parenquimatosa de A β en las hembras APP23 en todas las edades estudiadas, confirmando los resultados obtenidos en un estudio reciente en el que se demostró una mayor amiloidosis y astrogliosis en las hembras de este mismo genotipo²⁰. Por el contrario, las diferencias en el sexo en el modelo 5xFAD solo se observaron a edades tempranas, a los 4 y 8 meses, mostrando las hembras una mayor patología. De hecho, en la publicación original del modelo 5xFAD, a pesar de que los ratones tenían un fondo genético híbrido B6SJL diferente al nuestro (C57BL6/J), también observaron una tendencia a la alta en las hembras¹⁴, y curiosamente se ha descrito que la patología de EA en el transcriptoma del hipocampo de hembras de 4 meses 5xFAD era mayor que en los machos²¹.

En conjunto, los resultados en ambos modelos experimentales demostraron ser comparables a la patología de EA en humanos, donde además de la edad y de ser portador del alelo APOE4²², el sexo femenino podría jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, estudios neuropatológicos en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA también confirman nuestros resultados, reportando un depósito parenquimatoso de A β más extenso en mujeres^{23,24}. Asimismo, es importante destacar que aunque los esteroides y las hormonas sexuales se han propuesto como uno de los componentes claves para explicar las diferencias que subyacen en el sesgo del sexo en la EA^{22,25,26}, los mecanismos exactos no se conocen y siguen siendo objeto de estudio²⁷. En este sentido, mientras que la disminución de estrógenos se ha relacionado con la progresión de EA tras la menopausia²⁸, un gran ensayo clínico realizado en mujeres encontró, al contrario de lo que se esperaba, que la terapia hormonal basada en estrógenos se asociaba a un mayor riesgo de desarrollar demencia²⁹. Por otro lado, más recientemente se ha visto que la testosterona es capaz de reducir *in vivo* e *in vitro* la deposición de A β en modelos de EA^{30,31}, proponiendo así

el posible papel protector de esta hormona³². La investigación sobre los mecanismos que puedan explicar estas diferencias en el sexo observadas tanto en modelos preclínicos como en la patología humana es esencial para desarrollar futuras estrategias efectivas en el tratamiento de la EA.

1.3 Evolución del depósito β -amiloide en la vasculatura cerebral y su relación con el genotipo y el sexo

Debido a la alta interacción entre la EA y AAC y al papel compartido del péptido A β en ambas patologías, quisimos evaluar el depósito de este péptido a lo largo de la vasculatura cerebral en ambos modelos experimentales. De acuerdo con estudios previos, nuestros resultados confirmaron la acumulación progresiva de A β en los vasos cerebrales de ratones APP23 con la edad^{8,33,34}. Además, la inmunodetección con anticuerpos específicos de A β 40 y A β 42 reveló una mayor detección cerebral de A β 40, confirmando así que el ratio A β 40:A β 42 en estos ratones está incrementado y que, seguramente, sea uno de los motivos por el cual el depósito amiloide se pueda desplazar desde el parénquima a la vasculatura cerebral^{34,35}. En este sentido, el péptido A β 42 es más hidrofóbico y tiende a formar fibras, por lo que es más probable que se retenga en el parénquima formando depósitos extracelulares, mientras que el A β 40 es mucho más soluble y puede difundirse a lo largo de las vías de drenaje perivascular para finalmente acumularse en las paredes de los vasos cerebrales³⁶. Desafortunadamente, aún no se han esclarecido totalmente los mecanismos que explican la deposición preferencial de A β 40 en vasos y de A β 42 en placas. Cabe señalar que mientras las hembras APP23 mostraron una mayor patología parenquimatosa, no encontramos diferencias aparentes en la carga vascular de A β entre sexos. En este contexto, planteamos la hipótesis de que el aclaramiento de A β parenquimatoso podría estar modulado por mecanismos específicos del sexo, mientras que el aclaramiento de A β vascular parece no estarlo. Sin embargo, como mencionamos anteriormente, es necesario realizar más estudios para comprender la contribución del sexo en las patologías asociadas con A β .

Por otro lado, no detectamos vasos positivos para A β en los ratones 5xFAD con la tinción específica de resorufina. En particular, aunque los vasos corticales no mostraron inmunorreactividad para A β 40, algunas arterias leptomeníngicas de ratones a edades avanzadas sí se tiñeron de manera irregular con los anticuerpos A β 42 y A β 40. En este contexto, el estudio de la contribución de la patología de AAC en el modelo 5xFAD ha sido escaso y sigue existiendo controversia al respecto. Bajo nuestro conocimiento, sólo

existe una publicación previa que haya reportado AAC en los vasos leptomeníngeos de estos ratones de 3 a 5 meses de edad por microcopia fotónica *in vivo*³⁷. Sin embargo, el número de ratones incluidos en el estudio fue muy reducido, y la carga total de AAC fue muy variable entre ellos, incluso llegándose a no observar AAC en uno de los cinco ratones incluidos en su estudio. Por el contrario, en otro estudio previo se demostró la ausencia de AAC en ratones 5xFAD de hasta 9 meses de edad utilizando técnicas clásicas de inmunotinción³⁸. A priori, podríamos esperar que la patología de AAC apareciera más tarde en estos ratones, pero es importante remarcar que nosotros estudiamos la patología vascular hasta los 16 meses de edad y no encontramos signos de AAC en ratones 5xFAD. Por otro lado, el estudio anterior también encontró niveles cerebrales más altos de A β 42 soluble e insoluble en comparación con los niveles de A β 40³⁸. No obstante, aunque las mutaciones que portan los ratones 5xFAD en el gen PS1 favorecen la producción de A β 42 aumentando el ratio A β 42:A β 40, nuestros resultados de inmunohistoquímica mostraron una positividad cerebral muy moderada de A β 42 y A β 40 en ratones de edad avanzada. Una posible explicación podría ser la acumulación cerebral de especies truncadas de A β y péptidos de A β modificados con piroglutamato en estos ratones, como ya informaron Jawhar *et al*¹³. Sin embargo, nuestros hallazgos deben explorarse más a fondo utilizando una metodología biológica complementaria.

Por último, es importante resaltar que el A β tiene un origen neuronal común en los ratones transgénicos APP23 y 5xFAD, y que los péptidos que se generan no están mutados, puesto que las mutaciones que albergan en PPA están fuera de la zona que codifica para el péptido A β en los dos modelos^{8,14,18}. Sin embargo, la velocidad con la que se genera y el lugar donde finalmente se depositan los péptidos en el cerebro de estos ratones no es, ni mucho menos, la misma. Todo esto no sólo indica que el A β puede migrar y acumularse en un lugar diferente del que se genera, sino que también sugiere que las mutaciones en los genes PPA y PS1 influyen en todo este proceso. De hecho, estudios en pacientes con EA familiar han observado que mutaciones en el gen PS1 en determinadas posiciones específicas favorecen la patología vascular de A β ^{39,40}. Por tanto, el proceso de formación parece clave para determinar la agregación del péptido y su longitud. En el modelo 5xFAD se formaría una “semilla” muy insoluble que rápidamente atraparía el amiloide en el parénquima cerebral impidiendo su desplazamiento hacia la vasculatura.

1.4 Estudio del fenotipo clínico de AAC en los modelos experimentales

Finalmente, para evaluar el fenotipo clínico de la AAC a nivel experimental, estudiamos la presencia de MSC en los cerebros de ratones de ambos modelos transgénicos a una edad de 20 meses por RM pre-clínica. En este sentido, una de las teorías más aceptadas es que la acumulación de A β en los vasos cerebrales humanos conduce a la degeneración del musculo liso en la pared de los vasos, dando lugar a una disfunción de la BHE y ocasionalmente, a la rotura de estos vasos y a la extravasación de sangre en el parénquima cerebral, visualizando así los microsangrados por RM^{41,42}.

Es importante mencionar que el principal factor limitante que determinó la edad en la que evaluamos el fenotipo clínico de la AAC en estos modelos fue, como hemos mencionado anteriormente, la elevada mortalidad que experimentaron los ratones 5xFAD a partir de los 18 meses de edad. Sin embargo, fuimos capaces de detectar MSC en ratones APP23 a los 20 meses, confirmando los resultados de estudios previos en los que el número de MSC aumentaba progresivamente con la edad a partir de los 16 meses^{34,43,44}. De hecho, el tamaño medio de las lesiones observadas por estos autores coincide con el tamaño que reportamos nosotros en el estudio (diámetro 200-300 μ m)^{34,43,44}. Por otro lado, las alteraciones en la microvasculatura en este modelo experimental también se pueden detectar por angiografía por RM⁴⁵. Sin embargo, un número muy reducido de estudios ha evaluado el papel de la BHE en el modelo APP23, algo que, sin embargo, resultaría esencial para poder llegar a comprender la disfunción de la BHE y por consiguiente, la aparición de MSC en estos ratones. No obstante, en base a nuestros resultados, podemos concluir que el modelo APP23 es un modelo muy valioso para estudiar las consecuencias clínicas de la patología de AAC en comparación con otros modelos transgénicos de AAC familiar, en los que las primeras hemorragias aparecen a una edad muy tardía (ratones APPDutch)⁴⁶ o son muy escasas (ratones SwDI)⁴⁷. Por el contrario, a pesar de que la patología amiloide fue muy abundante en los ratones 5xFAD, solo pudimos detectar algún MSC esporádico en estos ratones. Tampoco observamos diferencias en el número de MSC entre los ratones 5xFAD y los ratones WT, presumiblemente, debido a la ausencia de una patología de AAC remarcada como hemos comentado anteriormente. Aun así, se ha demostrado que los ratones 5xFAD que portan alelos humanos de APOE (E3 y/o E4) sí presentan MSC asociados a AAC^{48,49}. Esto se podría explicar, en gran medida, por la implicación del gen APOE como principal factor de riesgo en la AAC humana y por su relación con la recurrencia

hemorrágica⁵⁰⁻⁵². En este estudio, los autores sugirieron que los sangrados cerebrales precederían a las placas de A β y, que de hecho, podrían sembrar su formación. De forma contraria a su hipótesis, nuestros resultados demuestran que los MSC constituyen un evento tardío en la β -amiloidosis cerebral en ratones APP23, reforzando la teoría de que el depósito de A β sería lo que desencadenaría el daño en la vasculatura cerebral y la posterior aparición de microsangrados.

Como conclusión de este primer estudio, consideramos que la caracterización de los modelos experimentales de uso común en el campo de la EA y la AAC es indispensable para asegurar una mayor traslación de los resultados preclínicos a ensayos clínicos en humanos. La comparación de procesos biológicos en estudio en diferentes modelos de ratones con diferentes fenotipos es una buena oportunidad para confirmar o descartar hipótesis preestablecidas en el campo de la β -amiloidosis cerebral.

2. Búsqueda de biomarcadores asociados a la AAC

Tras confirmar la validez del modelo APP23 para el estudio tanto de EA como de AAC, abordamos el segundo objetivo, la búsqueda de nuevos biomarcadores implicados en el depósito vascular de A β . Como hemos mencionado previamente, el descubrimiento de nuevas proteínas asociadas específicamente con el A β vascular es de vital importancia no sólo para una mejor comprensión de los mecanismos patológicos subyacentes, sino también para encontrar nuevos factores que sean capaces de inhibir o promover la interacción con el A β en la AAC y poder proponer así nuevos tratamientos modificadores de la enfermedad. Para llevar a cabo este objetivo, utilizamos un enfoque en el que combinamos el uso de microdissección láser junto con espectrometría de masas en tejido cerebral del modelo experimental APP23. La estrategia de descubrimiento de estas nuevas moléculas asociadas a AAC se llevó a cabo en ratones APP23 de 24 meses de edad, ya que en base a los resultados obtenidos anteriormente, era la edad donde se detectó la mayor acumulación de amiloide en el cerebro. En este contexto, es importante mencionar que mientras que estos enfoques proteómicos han sido ampliamente usados en modelos experimentales de EA^{53,54}, la identificación de biomarcadores relacionados con la AAC y su posible implicación en la patología ha sido mucho menos explorado.

En primer lugar, los datos que obtuvimos de los análisis proteómicos confirmaron la presencia de proteínas que se habían asociado anteriormente con el depósito amiloide

parenquimatoso y vascular, tanto en modelos experimentales como en muestras humanas, como ApoJ y ApoE⁵⁵⁻⁵⁸. De esta forma, reafirmamos la utilidad del modelo APP23 al validar la presencia de candidatos que ya habían sido identificados previamente en otros estudios. Asimismo, identificamos específicamente dos proteínas asociadas con el A β vascular en el cerebro de los ratones APP23, TIMP3 y MFG-E8. Centramos nuestro estudio en la proteína MFG-E8 (*del inglés, Milk Fat Globule-EGF factor 8*) ya que TIMP3 había sido descrita previamente en vasos cerebrales de pacientes con AAC^{59,60}.

2.1 Expresión de MFG-E8 en la AAC

MFG-E8, también conocida como Lactadherin, es una glicoproteína expresada por una gran variedad de células entre las que se encuentran las células epiteliales, células del músculo liso vascular, células dendríticas, y astrocitos y microglía⁶¹. Esta proteína se ha asociado previamente con diversas funciones fisiológicas y patológicas en el SNC, incluyendo la fagocitosis de células apoptóticas⁶²⁻⁶⁴, funciones anti-inflamatorias^{65,66} y la regeneración tisular⁶⁷, entre otras. De hecho, se ha observado que MFG-E8 es capaz de unirse al A β 42 *in vitro* y atenuar la toxicidad generada por los oligómeros de A β a través de la activación de la microglía, sugiriendo que podría facilitar el aclaramiento del mismo a través de las células gliales^{68,69}. Por otro lado, el papel beneficioso de esta proteína ha sido ampliamente estudiado en modelos experimentales de isquemia cerebral en los que el tratamiento exógeno con MFG-E8 ha demostrado reducir el volumen de infarto y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias^{70,71}. Asimismo, el papel anti-inflamatorio y anti-apoptótico de MFG-E8 también se ha observado en modelos de lesión cerebral traumática en rata tras la administración de proteína recombinante de MFG-E8⁷². De hecho, un estudio muy reciente también ha señalado que la administración intracerebroventricular de MFG-E8 tras inducir una hemorragia subaracnoidea en ratones disminuye el edema cerebral atenuando la inflamación⁷³. No obstante, bajo nuestro conocimiento, esta es la primera vez que MFG-E8 se ha asociado específicamente con el A β vascular en la AAC.

En este contexto, tras el análisis de los niveles cerebrales de MFG-E8, observamos una expresión aumentada de esta proteína en ratones APP23 en comparación con ratones WT, así como una presencia más alta en los vasos cerebrales positivos de A β de estos ratones por técnicas de inmunofluorescencia. Además, confirmamos estos resultados en tejido cerebral de pacientes con AAC y observamos una fuerte asociación entre la

presencia de MFG-E8 y los vasos corticales afectados por A β , pero no con la carga parenquimatosa de A β . De hecho, tampoco encontramos una asociación entre la expresión de MFG-E8 y el riesgo de EA evaluado en términos neuropatológicos. No obstante, en un estudio publicado previamente se observó una disminución en los niveles de mRNA de esta proteína en muestras de tejido cerebral de pacientes con EA⁶⁸. Cabe señalar que no se evaluó la expresión génica de MFG-E8 en muestras cerebrales de pacientes con AAC y tampoco se describió su prevalencia en la cohorte de EA, por lo que lo hace incomparable con nuestro estudio. Sin embargo, en este mismo trabajo se describió una expresión reducida de MFG-E8 por técnicas inmunohistoquímicas en áreas cerebrales enriquecidas en placas neuríticas en pacientes de EA⁶⁸, lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados en ratones APP23 y tejido cerebral de pacientes con AAC.

Diferentes estudios han descrito una asociación directa entre la expresión de MFG-E8, y la edad⁷⁴⁻⁷⁶. En nuestro estudio, en cambio, MFG-E8 no se asoció con la edad en ninguna de las cohortes humanas analizadas. Esta discrepancia entre resultados podría explicarse por el rango de edad empleado en cada una de los estudios. De hecho, cuando evaluamos la expresión cerebral de MFG-E8 en ratones APP23 en un amplio rango de edad (de 12 a 24 meses) sí observamos una contribución significativa de la edad, mientras que en los estudios con muestras humanas este rango era muy limitado. De hecho, es importante señalar que detectamos la presencia de MFG-E8 en vasos leptomenígeos de sujetos control e incluso en la vasculatura de ratones WT de 24 meses de edad. Por ello, creemos que valdría la pena evaluar los efectos de la expresión de MFG-E8 a edades más tempranas para entender su contribución al envejecimiento vascular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

2.2 Niveles de MFG-E8 circulante

La siguiente cuestión a abordar en este trabajo fue el posible origen celular de esta proteína. En este sentido, dado que MFG-E8 no se detectó en placas neuríticas, en microglía o en otras células del parénquima cerebral, era razonable suponer que la elevada presencia de esta proteína en vasos cerebrales podría resultar de su expresión en estas mismas células vasculares o que podría provenir de una fuente periférica.

Para ello, primero analizamos los niveles circulantes de MFG-E8 en el suero de pacientes con AAC. En este sentido, estudios previos han descrito niveles elevados de

MFG-E8 en el suero de pacientes con diferentes enfermedades inflamatorias^{77,78}, e incluso se ha observado una asociación entre estos niveles séricos incrementados y la presencia de lesiones cerebrales por RM en pacientes con lupus eritematoso sistémico⁷⁹. En base a esto, planteamos la hipótesis de que los niveles de MFG-E8 podrían estar alterados en el suero de pacientes con AAC debido a la alta prevalencia de LSB en esta patología^{42,80}. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias en los niveles séricos de esta proteína en pacientes con AAC en comparación con sujetos control o pacientes con EA. En cambio, en muestras de LCR, el grupo de AAC presentaba concentraciones más bajas de MFG-E8 que los grupos EA y los controles. De hecho, encontramos una correlación positiva entre los niveles de MFG-E8 y los niveles de A β 40 y A β 2 en el LCR, demostrando, una vez más, la fuerte asociación de esta proteína con los niveles de A β .

En este punto, es importante remarcar que los perfiles de biomarcadores en el LCR de las cohortes clínicas de pacientes usadas en nuestro estudio fueron consistentes con los perfiles reportados en estudios previos⁸¹⁻⁸³. En este sentido, los pacientes con AAC presentaron niveles más bajos de A β 42 y A β 40 que los controles; niveles de tau total más altos que los sujetos control pero muy similares a los de los pacientes con EA; y niveles de p-tau más bajos que los pacientes con EA pero más altos que los controles. Este perfil característico de biomarcadores concuerda con la hipótesis de que las concentraciones de estos marcadores en el LCR pueden reflejar cambios neuropatológicos en el cerebro^{84,85}. En este contexto, la disminución de los niveles de A β en el LCR de pacientes con AAC y EA posiblemente refleja un deterioro en el proceso de aclaramiento del péptido, potencialmente a través de la vía de drenaje perivascular, lo que podría explicar la deposición alterada de A β en el cerebro⁸⁶.

Teniendo todo lo anterior en cuenta, nuestros resultados referentes a los niveles de MFG-E8 en el LCR de los pacientes con AAC se podrían explicar de manera similar a lo que ocurre con el A β . De este modo, los niveles reducidos de MFG-E8 en el LCR de pacientes con AAC reflejarían la fuerte acumulación de esta proteína en la vasculatura cerebral. Por el contrario, como no detectamos MFG-E8 en los depósitos parenquimatosos de A β , la concentración de esta proteína en el LCR de pacientes con EA se mantendría igual que la de los sujetos control. Sin embargo, aunque estos resultados señalan a MFG-E8 como un candidato prometedor en el campo de la AAC, serán precisos más estudios para evaluar si los niveles de MFG-E8 en el LCR podrían

usarse para diferenciar la patología cerebrovascular del depósito de A β parenquimatoso y si se podría combinar con otros biomarcadores, como A β /p-Tau, para mejorar la precisión del diagnóstico de AAC. En cualquier caso, debido a la novedad del estudio presentado, nuestros hallazgos deben validarse en cohortes más grandes. En concreto, aunque se seleccionaron controles sanos y pacientes con EA por no presentar historia previa de lesiones hemorrágicas o ictus antes del reclutamiento, la superposición biológica entre la EA y la AAC hace que el método de selección de pacientes sea una limitación intrínseca del estudio.

2.3 Implicación funcional de MFG-E8 en la AAC

Finalmente, para determinar el posible papel funcional de MFG-E8 en la patología de AAC, tratamos de mimetizar este escenario patológico tratando las HBVSMC con el péptido A β 40, por ser el péptido mayoritario en los vasos cerebrales de pacientes con AAC esporádica, y con el péptido en su forma tóxica A β 40-D, el cual se genera en los pacientes con AAC familiar portadores de la mutación *Dutch* en PPA. En particular, sólo observamos una disminución significativa de la viabilidad celular con el tratamiento con A β 40-D, tal y como está descrito en la bibliografía^{87,88}. Asimismo, nuestros resultados mostraron un aumento específico en los niveles proteicos de MFG-E8 únicamente tras el tratamiento con la forma tóxica A β 40-D. De hecho, observamos un aumento significativo de la viabilidad celular con el tratamiento de rhMFG-E8, y de forma complementaria, la toxicidad inducida por el A β 40-D aumentó tras el silenciamiento de MFG-E8 en las HBVSMC. Por tanto, nuestros resultados sugieren que esta proteína podría ejercer un papel protector en la patología de AAC, reduciendo potencialmente la citotoxicidad de A β y previniendo el daño vascular inducido por este péptido. Aun así, se necesitan más estudios para aclarar si MFG-E8 participa en la fagocitosis de A β , actúa atenuando la inflamación a nivel vascular y reduciendo la apoptosis neuronal o a través de mecanismos alternativos.

En conclusión a este segundo estudio, la identificación específica de MFG-E8 como un nuevo marcador asociado a AAC puede contribuir a mejorar las herramientas de diagnóstico disponibles y a proponer nuevos enfoques terapéuticos. Se requieren estudios funcionales *in vivo* adicionales para esclarecer las vías moleculares involucradas en el papel protector de MFG-E8 en la patología de AAC. De acuerdo con el primer estudio presentado en esta tesis doctoral, sería interesante contrastar estos hallazgos en otros modelos experimentales de β -amiloidosis cerebral con un fenotipo

exclusivamente de depósito amiloide en parénquima, como es el caso del modelo transgénico 5xFAD.

3. Papel de la AQP4 en la AAC asociada a HIC

Continuando con el objetivo principal de buscar marcadores asociados a la AAC, en el último estudio de esta tesis doctoral evaluamos los niveles circulantes de AQP4 en el suero de pacientes que habían sufrido una HIC asociada a AAC con el fin de determinar si podría ser un biomarcador indicativo de esta patología.

3.1 ¿Es la AQP4 un biomarcador indicativo de AAC-HIC?

En este contexto, la AQP4 constituye el canal de agua más abundante del SNC y participa en el mantenimiento del equilibrio hídrico cerebral en condiciones fisiológicas y patológicas^{89,90}. De hecho, varios estudios han demostrado su implicación en diferentes patologías entre las que se encuentran el edema cerebral, el ictus isquémico, el traumatismo craneoencefálico o la neuromielitis óptica, entre otras^{89,91}. El interés creciente de esta proteína en el campo de la β -amiloidosis cerebral se debe a que estudios recientes han propuesto que la AQP4 podría tener un papel esencial en el aclaramiento de solutos, incluyendo el A β , entre el LCR y el LI a través del drenaje perivascular, sugiriendo así su posible implicación en la fisiopatología de la AAC y EA^{92,93}.

Hasta la fecha, la gran mayoría de los estudios que han explorado el papel de AQP4 en pacientes con EA y AAC han descrito una distribución alterada de esta proteína en tejido cerebral *post mortem*. En particular, mientras que uno de los estudios encontró una expresión reducida de AQP4 en pacientes con EA que presentaban AAC moderada o grave⁹⁴, estudios posteriores demostraron resultados opuestos, describiendo un aumento de la inmunoreactividad de esta proteína en cerebros de pacientes con EA y AAC en comparación con los controles⁹⁵⁻⁹⁷. De hecho, se ha sugerido que el patrón de expresión de AQP4 podría diferir dependiendo del estadio de la enfermedad, con un aumento de la inmunodetección de AQP4 en los casos de AAC con una puntuación neuropatológica asociada a EA más elevada⁹⁸. De acuerdo con esta última hipótesis, recientemente se ha descrito que el patrón de detección de AQP4 es diferente en la sustancia gris en comparación con la sustancia blanca cerebral y que difiere con la edad y con el grado de la patología⁹⁹. Teniendo todo esto en cuenta, la expresión de AQP4 en

el cerebro parece estar asociada a diferentes factores, como la edad, la gravedad de la AAC y el área neuroanatómica específica. Más allá del estudio de la expresión de AQP4 en tejido cerebral, la posible alteración de los niveles plasmáticos de AQP4 en pacientes con EA o AAC aún no se había explorado. En este contexto, en nuestro estudio, demostramos por primera vez la presencia de AQP4 en el suero de pacientes con AAC-HIC. Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles séricos de esta proteína entre pacientes y sujetos control. A continuación, con el objetivo de explorar si los niveles séricos de AQP4 podrían contribuir al diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad, analizamos su posible asociación con las principales características de neuroimagen de la AAC.

En este contexto, no observamos asociación entre los niveles de AQP4 y los marcadores radiológicos comunes como siderosis o espacios perivasculares dilatados. Sin embargo, encontramos niveles circulantes de AQP4 más bajos en pacientes con deterioro cognitivo, aunque tras corregir por comparaciones múltiples, esta asociación se perdió. En cualquier caso, este resultado era concordante con estudios en modelos preclínicos, donde ratones deficientes para AQP4 mostraron importantes déficits cognitivos en diferentes test de comportamiento¹⁰²⁻¹⁰⁴. Además, estudios realizados específicamente en modelos de ratones transgénicos de EA y AAC también confirmaron que la depleción de AQP4 promovía los déficits cognitivos y aumentaba la acumulación de A β y la disfunción sináptica¹⁰⁵, sugiriendo así una posible contribución de AQP4 en el aclaramiento de A β a través de la vasculatura cerebral. En contraste con estos resultados, un estudio reciente realizado en ratones 5xFAD, no ha demostrado alteraciones en la acumulación de A β ni en los déficits de memoria tras la depleción de AQP4¹⁰⁶. No obstante, como hemos mencionado anteriormente, los últimos estudios en tejido cerebral de pacientes con EA y AAC apuntan a que AQP4 podría estar involucrada en la eliminación de A β a través del drenaje perivascular, desempeñando así un posible papel protector en la patología de AAC. Sin embargo, es importante resaltar que en nuestro estudio no encontramos una asociación entre los niveles circulantes de AQP4 y la puntuación global de SVD, la cual se asocia con hallazgos patológicos y clínicos de la AAC¹⁰⁷. Por tanto, nuestros resultados muestran que la AQP4 circulante no es un biomarcador indicativo de patología AAC. Aun así, debido a la implicación de AQP4 con el aclaramiento de solutos, evaluar en un futuro los niveles de AQP4 en el LCR de estos

pacientes podría arrojar luz sobre la implicación de esta proteína en este proceso biológico.

3.2 AQP4 y carga hemorrágica en la AAC-HIC

Por otro lado, nuestros resultados demostraron una sorprendente asociación entre los niveles séricos de AQP4 y las lesiones hemorrágicas relacionadas con la AAC en la cohorte de estudio. En particular, los pacientes con AAC-HIC que presentaban ≥ 2 HIC y/o ≥ 5 MSC lobares presentaban niveles más bajos de AQP4 en comparación con los pacientes que sin eventos hemorrágicos. Además, observamos una correlación negativa entre el número de HIC lobares y los niveles séricos de AQP4, sugiriendo así, un posible papel protector de esta proteína. De hecho, diferentes estudios experimentales previos mostraron que la depleción de AQP4 agravaba el deterioro neurológico y promovía la muerte neuronal tras la HIC^{108,109}.

Recientemente también se ha descubierto que las variantes genómicas de AQP4 son predictores independientes del resultado funcional tras una HIC en diferentes poblaciones^{110,111}. En este contexto, nuestros resultados mostraron que los niveles circulantes de AQP4, junto con el alelo Apo ϵ 2, la atrofia y las variables de alta carga de SVD eran predictores independientes de presentar ≥ 2 HIC lobares. De hecho, el alelo Apo ϵ 2 es un factor de riesgo ampliamente relacionado con la AAC y que predispone a los pacientes a hemorragias recurrentes^{112,113}.

Por otra parte, debido a la localización específica de AQP4 en los pies de los astrocitos, se ha sugerido que podría desempeñar un papel en el mantenimiento de la integridad de la BHE¹¹⁴. Aunque la mayoría de los estudios parecen apuntar hacia un papel protector de la AQP4, todavía existe controversia al respecto, ya que no está del todo esclarecido que la depleción de AQP4 altere la integridad de la BHE después de la HIC¹¹⁵⁻¹¹⁸. Por todo ello, se necesitan más estudios para confirmar la función exacta de AQP4 en el cerebro tras un evento hemorrágico. De hecho, sería interesante ampliar nuestros hallazgos a otras cohortes que presenten HIC independientemente de la etiología amiloide.

3.3 AQP4 en el pronóstico del resultado funcional tras una HIC

Finalmente, nuestro estudio también reveló que el análisis de AQP4 en suero podría potencialmente predecir el resultado funcional a largo plazo en pacientes con AAC-HIC. En particular, mostramos que los pacientes con un buen resultado funcional a largo plazo

tenían niveles circulantes de AQP4 más altos que aquellos que presentaban un mal resultado funcional y que los controles sanos. En este contexto, sólo tenemos constancia de un estudio que haya analizado los niveles circulantes de AQP4 en trastornos neurológicos, reportando, de hecho, niveles incrementados de AQP4 en pacientes con ictus isquémico tras superar la fase aguda de la enfermedad¹¹⁹. Además, en este mismo estudio, se encontró que AQP4 era un predictor independiente de un buen resultado neurológico en pacientes con ictus. En general, el aumento de los niveles circulantes de AQP4 en pacientes con AAC-HIC que presentan una mejoría funcional a largo plazo, junto con la disminución de los niveles de esta proteína en pacientes con una mayor carga hemorrágica cerebral, proporcionan una evidencia del papel potencialmente protector de AQP4 después de la HIC.

Por último, es importante mencionar algunas de las limitaciones presentes en este tercer estudio. Primero, el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño, lo que pudo enmascarar algunas asociaciones no detectables tras corregir por comparaciones múltiples. Otras limitaciones incluyen el diseño transversal del estudio y las diferencias en los puntos temporales del reclutamiento y de la evaluación del resultado funcional tras el evento hemorrágico. De hecho, por esta razón decidimos dividir la cohorte total en dos subgrupos, reduciendo aún más el tamaño de la muestra. Teniendo todo esto en cuenta, consideramos que estudios futuros deberían centrarse en cohortes de pacientes más grandes con una evaluación funcional en diferentes puntos temporales para poder explorar así si nuestros hallazgos podrían llegar a ser útiles en la predicción clínica del resultado funcional a largo plazo en pacientes con HIC. También sería interesante estudiar el perfil temporal de AQP4, así como evaluar la asociación entre los niveles circulantes de AQP4 y la progresión de los marcadores de neuroimagen con una extracción de sangre de seguimiento y una RM en diferentes momentos.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La acumulación progresiva de depósitos parenquimatosos y vasculares de A β y la identificación de microsangrados cerebrales, como consecuencia clínica común en la AAC, ha confirmado la validez del modelo APP23 para el estudio tanto de la AAC como de la EA. La ausencia de patología asociada a AAC en el modelo 5xFAD ha reafirmado el uso de este modelo para el estudio exclusivo de la EA.
2. El enfoque de microdissección láser combinado con espectrometría de masas ha permitido la identificación de la proteína MFG-E8 en la vasculatura cerebral asociada a A β en el modelo transgénico APP23 de β -amiloidosis cerebral. La posterior validación de este candidato en muestras de pacientes con AAC ha demostrado que los resultados obtenidos en este modelo experimental pueden transferirse con éxito a estudios en humanos.
3. En los vasos cerebrales positivos para A β se ha detectado una elevada presencia de MFG-E8, mientras que esta proteína estaba ausente en las placas neuríticas. En el LCR de pacientes con AAC se han encontrado niveles reducidos de MFG-E8 en comparación a pacientes con EA y a sujetos control. Hemos comprobado que el tratamiento *in vitro* de células vasculares del músculo liso humanas con la variante tóxica A β 40-*Dutch* (A β 40-D) inducía un aumento en la expresión de MFG-E8. Además, un incremento de los niveles de MFG-E8 han demostrado ser protectores frente al daño vascular ocasionado por el péptido A β 40-D *in vitro*. El conjunto de estos resultados propone a MFG-E8 como un nuevo marcador específico para la AAC que podría ayudar a explorar herramientas diagnósticas más precisas y proponer nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar tratamientos modificadores de la enfermedad en un futuro cercano.
4. La posible implicación de AQP4 en el aclaramiento de solutos a través de las vías de drenaje perivascular promovió el estudio de esta proteína como un posible biomarcador indicativo de AAC. No obstante, aunque AQP4 no demostró ser un biomarcador de diagnóstico, hemos podido identificar una asociación negativa entre los niveles séricos de AQP4 y la carga hemorrágica detectada

por RM en pacientes con HIC asociada a AAC. Además, hemos encontrado niveles elevados de AQP4 en el suero de aquellos pacientes que presentaban un buen resultado funcional a largo plazo. Estos resultados sugieren que esta proteína podría desempeñar un papel protector tras un evento hemorrágico. Serán necesarios futuros estudios para determinar la implicación de AQP4 en la hemorragia cerebral y su potencial para mejorar la precisión del pronóstico funcional en pacientes con una HIC lobar.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Merlini G, Bellotti V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2003. doi:10.1056/nejmra023144
2. Chen GF, Xu TH, Yan Y, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. 2017. doi:10.1038/aps.2017.28
3. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613
4. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007. doi:10.1038/nrn2168
5. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011. doi:10.1186/1756-6606-4-3
6. Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 2012. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x
7. Love S, Miners S, Palmer J, Chalmers K, Kehoe P. Insights into the pathogenesis and pathogenicity of cerebral amyloid angiopathy. *Front Biosci*. 2009. doi:10.2741/3567
8. Burgermeister P, Calhoun ME, Winkler DT, Jucker M. Mechanisms of cerebrovascular amyloid deposition. Lessons from mouse models. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. ; 2000. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06381.x
9. Qi X mei, Ma J fang. The role of amyloid beta clearance in cerebral amyloid angiopathy: More potential therapeutic targets. *Transl Neurodegener*. 2017. doi:10.1186/s40035-017-0091-7
10. Goulay R, Mena Romo L, Hol EM, Dijkhuizen RM. From Stroke to Dementia: a Comprehensive Review Exposing Tight Interactions Between Stroke and Amyloid- β Formation. *Transl Stroke Res*. 2020. doi:10.1007/s12975-019-00755-2
11. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, et al. Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(8):457-470. doi:10.1038/nrneurol.2015.119
12. Saito S, Ihara M. New therapeutic approaches for Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front Aging Neurosci*. 2014;6(OCT):1-11. doi:10.3389/fnagi.2014.00290
13. Bates KA, Verdile G, Li QX, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-B peptide: Implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry*. 2009. doi:10.1038/mp.2008.96
14. Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: Recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012. doi:10.1136/jnnp-2011-301308

15. Nalivaeva N, Fisk L, Belyaev N, Turner A. Amyloid-Degrading Enzymes as Therapeutic Targets in Alzheimers Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2008. doi:10.2174/156720508783954785
16. Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. doi:10.1073/pnas.0230450100
17. Leissring MA, Farris W, Chang AY, et al. Enhanced proteolysis of β -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* 2003. doi:10.1016/S0896-6273(03)00787-6
18. 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. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06899.x
19. Hernandez-Guillamon M, Mawhirt S, Blais S, et al. Sequential amyloid- β degradation by the matrix metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *J Biol Chem.* 2015. doi:10.1074/jbc.M114.610931
20. Ries M, Sastre M. Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. *Front Aging Neurosci.* 2016. doi:10.3389/fnagi.2016.00160
21. Fiala M, Cribbs DH, Rosenthal M, Bernard G. Phagocytosis of amyloid- β and inflammation: Two faces of innate immunity in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2007. doi:10.3233/JAD-2007-11406
22. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005. doi:10.1124/pr.57.2.4
23. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011. doi:10.1038/nrn3114
24. DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, et al. ApoE and Clusterin Cooperatively Suppress A β Levels and Deposition: Evidence that ApoE Regulates Extracellular A β Metabolism In Vivo. *Neuron.* 2004. doi:10.1016/S0896-6273(03)00850-X
25. Bu G. Apolipoprotein e and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2009. doi:10.1038/nrn2620
26. Carrano A, Hoozemans JJM, Van Der Vies SM, Rozemuller AJM, Van Horsen J, De Vries HE. Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxidants Redox Signal.* 2011. doi:10.1089/ars.2011.3895
27. Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, et al. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2006. doi:10.1007/s00401-006-0115-3
28. Deane R, Yan S Du, Submamaryan RK, et al. RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003. doi:10.1038/nm890

29. Weller RO, Preston SD, Subash M, Carare RO. Cerebral amyloid angiopathy in the aetiology and immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther.* 2009;1(2):6. doi:10.1186/alzrt6
30. Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, 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. doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00926.x
31. Keable A, Fenna K, Yuen HM, et al. Deposition of amyloid β in the walls of human leptomeningeal arteries in relation to perivascular drainage pathways in cerebral amyloid angiopathy. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2016. doi:10.1016/j.bbadis.2015.08.024
32. Carare RO, Aldea R, Agarwal N, 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 . *Alzheimer's Dement Diagnosis, Assess Dis Monit.* 2020. doi:10.1002/dad2.12053
33. Toriello M, González-Quintanilla V, Pascual J. The glymphatic system and its involvement in disorders of the nervous system. *Med Clínica (English Ed.* 2021. doi:10.1016/j.medcle.2021.03.003
34. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, 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. doi:10.1126/scitranslmed.3003748
35. Iliff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, et al. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-Interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci.* 2013. doi:10.1523/JNEUROSCI.1592-13.2013
36. Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2009. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.01.023
37. Mofkhar P, Lynch MD, Pomakian JL, Vinters H V. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010. doi:10.1097/NEN.0b013e3181fd252c
38. Boespflug EL, Simon MJ, Leonard E, et al. Targeted Assessment of Enlargement of the Perivascular Space in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia Subtypes Implicates Astroglial Involvement Specific to Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2018. doi:10.3233/JAD-180367
39. Hoshi A, Tsunoda A, Yamamoto T, Tada M, Kakita A, Ugawa Y. Altered expression of glutamate transporter-1 and water channel protein aquaporin-4 in human temporal cortex with Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018. doi:10.1111/nan.12475
40. Hoshi A, Yamamoto T, Shimizu K, et al. Characteristics of Aquaporin Expression Surrounding Senile Plaques and Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71(8):750-759. doi:10.1097/NEN.0b013e3182632566

41. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2018;17(11):1016-1024. doi:10.1016/S1474-4422(18)30318-1
42. Hawkes CA, Jayakody N, Johnston DA, Bechmann I, Carare RO. Failure of Perivascular Drainage of β -amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Brain Pathol.* 2014;24(4):396-403. doi:10.1111/bpa.12159
43. Preston SD, Steart P V., Wilkinson A, Nicoll JAR, Weller RO. Capillary and arterial cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: Defining the perivascular route for the elimination of amyloid β from the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003. doi:10.1046/j.1365-2990.2003.00424.x
44. Hawkes CA, Härtig W, Kacza J, et al. Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 2011. doi:10.1007/s00401-011-0801-7
45. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* 2017;140(7):1829-1850. doi:10.1093/brain/awx047
46. Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral haemorrhage. *Lancet.* 2009. doi:10.1016/S0140-6736(09)60371-8
47. Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog Neurobiol.* 2010. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.08.001
48. Ziai WC, Carhuapoma JR. Intracerebral Hemorrhage. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2018. doi:10.1212/CON.0000000000000672
49. Charidimou A, Meegahage R, Fox Z, et al. Enlarged perivascular spaces as a marker of underlying arteriopathy in intracerebral haemorrhage: A multicentre MRI cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013. doi:10.1136/jnnp-2012-304434
50. 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. doi:10.5492/wjccm.v4.i3.213
51. Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. In: *Stroke.* ; 2004. doi:10.1161/01.STR.0000143224.36527.44
52. Charidimou A, Peeters A, Fox Z, et al. Spectrum of Transient Focal Neurological Episodes in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke.* 2012;43(9):2324-2330. doi:10.1161/STROKEAHA.112.657759
53. Van Nostrand WE, Melchor JP, Romanov G, Zeigler K, Davis J. Pathogenic effects of cerebral amyloid angiopathy mutations in the amyloid β -protein precursor. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* ; 2002. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04824.x
54. Wattendorff AR, Frangione B, Luyendijk W, Bots GTAM. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis, Dutch type (HCHWA-D): Clinicopathological

- studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995. doi:10.1136/jnnp.58.6.699
55. Bugiani O, Giaccone G, Rossi G, et al. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Arch Neurol*. 2010. doi:10.1001/archneurol.2010.178
 56. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, et al. The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001. doi:10.1038/nn0901-887
 57. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1992. doi:10.1038/ng0692-218
 58. 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. doi:10.1002/ana.1009
 59. 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. doi:10.1002/ana.410430124
 60. Dermaut B, Kumar-Singh S, De Jonghe C, et al. Cerebral amyloid angiopathy is a pathogenic lesion in Alzheimer's disease due to a novel presenilin 1 mutation. *Brain*. 2001. doi:10.1093/brain/124.12.2383
 61. 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. doi:10.1002/dneu.22709
 62. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984. doi:10.1016/0006-291X(84)91209-9
 63. Motte J, Williams RS. Age-related changes in the density and morphology of plaques and neurofibrillary tangles in Down syndrome brain. *Acta Neuropathol*. 1989. doi:10.1007/BF00687256
 64. Head E, Phelan MJ, Doran E, et al. Cerebrovascular pathology in Down syndrome and Alzheimer disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2017. doi:10.1186/s40478-017-0499-4
 65. Mann DMA, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, et al. Amyloid angiopathy and variability in amyloid β deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001. doi:10.1016/S0002-9440(10)64688-3
 66. Buss L, Fisher E, Hardy J, et al. Intracerebral haemorrhage in Down syndrome: protected or predisposed? *F1000Research*. 2016. doi:10.12688/f1000research.7819.1
 67. Corovic A, Kelly S, Markus HS. Cerebral amyloid angiopathy associated with inflammation: A systematic review of clinical and imaging features and outcome. *Int J Stroke*. 2018. doi:10.1177/1747493017741569

68. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: Emerging concepts. *J Stroke*. 2015. doi:10.5853/jos.2015.17.1.17
69. Vinters H V. Cerebral amyloid angiopathy a critical review. *Stroke*. 1987. doi:10.1161/01.STR.18.2.311
70. Attems J, Jellinger K, Thal DR, Van Nostrand W. Review: Sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01137.x
71. Vonsattel JPG, Myers RH, Tessa Hedley-Whyte E, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: A comparative histological study. *Ann Neurol*. 1991. doi:10.1002/ana.410300503
72. Thal DR, Papassotiropoulos A, Saido TC, et al. Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE ϵ 4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2010. doi:10.1007/s00401-010-0707-9
73. Attems J, Lauda F, Jellinger KA. Unexpectedly low prevalence of intracerebral hemorrhages in sporadic cerebral amyloid angiopathy: An autopsy study. *J Neurol*. 2008. doi:10.1007/s00415-008-0674-4
74. Keage HAD, Carare RO, Friedland RP, et al. Population studies of sporadic cerebral amyloid angiopathy and dementia: A systematic review. *BMC Neurol*. 2009;9:1-8. doi:10.1186/1471-2377-9-3
75. Boyle PA, Yu L, Nag S, et al. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology*. 2015. doi:10.1212/WNL.0000000000002175
76. Brenowitz WD, Nelson PT, Besser LM, Heller KB, Kukull WA. Cerebral amyloid angiopathy and its co-occurrence with Alzheimer's disease and other cerebrovascular neuropathologic changes. *Neurobiol Aging*. 2015. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.028
77. 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. doi:10.1002/ana.22112
78. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the boston criteria. *Neurology*. 2001. doi:10.1212/WNL.56.4.537
79. Linn J, Halpin A, Demaerel P, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2010;74(17):1346-1350. doi:10.1212/WNL.0b013e3181dad605
80. Charidimou A, Frosch MP, Salman RA-S, et al. Advancing diagnostic criteria for sporadic cerebral amyloid angiopathy: Study protocol for a multicenter MRI-pathology validation of Boston criteria v2.0. *Int J Stroke*. 2019;14(9):956-971. doi:10.1177/1747493019855888
81. Biffi A, Halpin A, Towfighi A, et al. Aspirin and recurrent intracerebral hemorrhage

- in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2010. doi:10.1212/WNL.0b013e3181eee40f
82. Vernooij MW, Haag MDM, Van Der Lugt A, et al. Use of antithrombotic drugs and the presence of cerebral microbleeds: The Rotterdam Scan Study. *Arch Neurol*. 2009. doi:10.1001/archneurol.2009.42
 83. Weber SA, Patel RK, Lutsep HL. Cerebral amyloid angiopathy: diagnosis and potential therapies. *Expert Rev Neurother*. 2018. doi:10.1080/14737175.2018.1480938
 84. Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Freijo MM, et al. Clinical practice guidelines in intracerebral haemorrhage. *Neurol (English Ed)*. 2013. doi:10.1016/j.nrleng.2011.03.011
 85. Bales KR, O'Neill SM, Pozdnyakov N, et al. Passive immunotherapy targeting amyloid- β reduces cerebral amyloid angiopathy and improves vascular reactivity. *Brain*. 2016. doi:10.1093/brain/awv313
 86. Leurent C, Goodman JA, Zhang Y, et al. Immunotherapy with ponezumab for probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(4):795-806. doi:10.1002/acn3.761
 87. Boulouis G, Charidimou A, Greenberg SM. Sporadic Cerebral Amyloid Angiopathy: Pathophysiology, Neuroimaging Features, and Clinical Implications. *Semin Neurol*. 2016. doi:10.1055/s-0036-1581993
 88. Greenberg SM, Vernooij MW, Cordonnier C, et al. Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation. *Lancet Neurol*. 2009. doi:10.1016/S1474-4422(09)70013-4
 89. Akoudad S, Ikram MA, Koudstaal PJ, et al. Cerebral microbleeds are associated with the progression of ischemic vascular lesions. *Cerebrovasc Dis*. 2014. doi:10.1159/000362590
 90. Charidimou A, Imaizumi T, Moulin S, et al. Brain hemorrhage recurrence, small vessel disease type, and cerebral microbleeds: A meta-analysis. *Neurology*. 2017. doi:10.1212/WNL.0000000000004259
 91. 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. doi:10.3389/fnagi.2019.00145
 92. Poels MMF, Vernooij MW, Ikram MA, et al. Prevalence and risk factors of cerebral microbleeds: An update of the rotterdam scan study. In: *Stroke*. ; 2010. doi:10.1161/STROKEAHA.110.595181
 93. Charidimou A, Jäger RH, Fox Z, et al. Prevalence and mechanisms of cortical superficial siderosis in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2013. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a08f2c
 94. Charidimou A, Boulouis G, Roongpiboonsopit D, et al. Cortical superficial siderosis and recurrent intracerebral hemorrhage risk in cerebral amyloid angiopathy: Large prospective cohort and preliminary meta-analysis. *Int J Stroke*.

2019. doi:10.1177/1747493019830065
95. Charidimou A, Boulouis G, Roongpiboonsopit D, et al. Cortical superficial siderosis multifocality in cerebral amyloid angiopathy: A prospective study. *Neurology*. 2017. doi:10.1212/WNL.0000000000004665
 96. Charidimou A, Peeters AP, Jäger R, et al. Cortical superficial siderosis and intracerebral hemorrhage risk in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2013. doi:10.1212/01.wnl.0000435298.80023.7a
 97. Boulouis G, Charidimou A, Pasi M, 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. doi:10.1016/j.jns.2017.07.015
 98. Prins ND, Scheltens P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: An update. *Nat Rev Neurol*. 2015. doi:10.1038/nrneuro.2015.10
 99. 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. doi:10.1161/JAHA.114.001140
 100. Smith EE, Gurol ME, Eng JA, et al. White matter lesions, cognition, and recurrent hemorrhage in lobar intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2004. doi:10.1212/01.WNL.0000142966.22886.20
 101. Chen SJ, Tsai HH, Tsai LK, et al. Advances in cerebral amyloid angiopathy imaging. *Ther Adv Neurol Disord*. 2019. doi:10.1177/1756286419844113
 102. Mortamais M, Artero S, Ritchie K. White Matter Hyperintensities as Early and Independent Predictors of Alzheimer's Disease Risk. *J Alzheimer's Dis*. 2014. doi:10.3233/JAD-141473
 103. Banerjee G, Kim HJ, Fox Z, et al. MRI-visible perivascular space location is associated with Alzheimer's disease independently of amyloid burden. *Brain*. 2017. doi:10.1093/brain/awx003
 104. Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Reijmer YD, et al. Total MRI small vessel disease burden in cerebral amyloid angiopathy: a concept validation imaging-pathological study. *JAMA Neurol*. 2016.
 105. Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Reijmer YD, et al. Total Magnetic Resonance Imaging Burden of Small Vessel Disease in Cerebral Amyloid Angiopathy. *JAMA Neurol*. 2016. doi:10.1001/jamaneurol.2016.0832
 106. Gurol ME, Becker JA, Fotiadis P, et al. Florbetapir-PET to diagnose cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2016. doi:10.1212/WNL.0000000000003197
 107. Greenberg SM, Grabowski T, Gurol ME, et al. Detection of isolated cerebrovascular β -amyloid with Pittsburgh compound B. *Ann Neurol*. 2008. doi:10.1002/ana.21528
 108. Ly J V., Donnan GA, Villemagne VL, et al. 11C-PIB binding is increased in patients with cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *Neurology*. 2010. doi:10.1212/WNL.0b013e3181cef7e3

109. Banerjee G, Carare R, Cordonnier C, et al. The increasing impact of cerebral amyloid angiopathy: essential new insights for clinical practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(11):982-994. doi:10.1136/jnnp-2016-314697
110. B.H. H, M.-L. Z, A.K. V, et al. Resorufin Analogs Preferentially Bind Cerebrovascular Amyloid: Potential Use as Imaging Ligands for Cerebral Amyloid Angiopathy. *Mol Neurodegener*. 2011.
111. Renard D, Castelnovo G, Wacogne A, et al. Interest of CSF biomarker analysis in possible cerebral amyloid angiopathy cases defined by the modified Boston criteria. *J Neurol*. 2012. doi:10.1007/s00415-012-6520-8
112. Van Etten ES, Verbeek MM, Van Der Grond J, et al. β -Amyloid in CSF: Biomarker for preclinical cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2017. doi:10.1212/WNL.0000000000003486
113. Verbeek MM, Kremer BPH, Rikkert MO, Van Domburg PHMF, Skehan ME, Greenberg SM. Cerebrospinal fluid amyloid β 40 is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2009. doi:10.1002/ana.21694
114. Charidimou A, Friedrich JO, Greenberg SM, Viswanathan A. Core cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology*. 2018. doi:10.1212/WNL.0000000000005030
115. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016. doi:10.1016/S1474-4422(16)00070-3
116. Kuiperij HB, Hondius DC, Kersten I, et al. Apolipoprotein D: a potential biomarker for cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2020. doi:10.1111/nan.12595
117. Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Penalba A, et al. Plasma β -amyloid levels in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Neurodegener Dis*. 2012. doi:10.1159/000333811
118. Greenberg SM, Cho HS, O'Donnell HC, et al. Plasma β -amyloid peptide, transforming growth factor- β 1, and risk for cerebral amyloid angiopathy. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. ; 2000. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06361.x
119. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2009. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.026
120. Zimmermann R, Huber E, Schamber C, et al. Plasma concentrations of the amyloid- β peptides in young volunteers: The influence of the APOE genotype. *J Alzheimer's Dis*. 2014. doi:10.3233/JAD-132687
121. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*. 1996. doi:10.1161/01.STR.27.8.1333
122. Liu Y, Yu JT, Wang HF, et al. APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg*

- Psychiatry*. 2015. doi:10.1136/jnnp-2014-307719
123. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011. doi:10.1016/S1474-4422(10)70325-2
 124. Li Z, Shue F, Zhao N, Shinohara M, Bu G. APOE2: protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2020. doi:10.1186/s13024-020-00413-4
 125. Greenberg SM, Vonsattel JPG, Segal AZ, et al. Association of apolipoprotein E and ϵ 2 vasculopathy in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 1998. doi:10.1212/WNL.50.4.961
 126. Biffi A, Sonni A, Anderson CD, et al. Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*. 2010. doi:10.1002/ana.22134
 127. Nicoll JAR, McCarron MO. APOE gene polymorphism as a risk factor for cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. In: *Amyloid*. ; 2001.
 128. Domingues-Montanari S, Hernandez-Guillamon M, Fernandez-Cadenas I, et al. ACE variants and risk of intracerebral hemorrhage recurrence in amyloid angiopathy. *Neurobiol Aging*. 2011. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.019
 129. Biffi A, Shulman JM, Jagiella JM, et al. Genetic variation at CR1 increases risk of cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2012. doi:10.1212/WNL.0b013e3182452b40
 130. Alzheimer's Disease International. *World Alzheimer Report 2019: Attitudes to Dementia*.; 2019.
 131. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019. doi:10.1016/j.cell.2019.09.001
 132. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012. doi:10.1101/cshperspect.a006171
 133. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016. doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1
 134. Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J Alzheimers Dis*. 2017. doi:10.3233/JAD-161149
 135. Pottier C, Wallon D, Rousseau S, et al. TREM2 R47H variant as a risk factor for early-onset alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2013. doi:10.3233/JAD-122311
 136. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*. 2015. doi:10.1016/j.biopsych.2014.05.006
 137. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011. doi:10.1101/cshperspect.a006189

138. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018. doi:10.1111/ene.13439
139. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016. doi:10.15252/emmm.201606210
140. 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. *Neurology*. 2002. doi:10.1212/WNL.58.12.1791
141. Walsh DM, Selkoe DJ. A β oligomers - A decade of discovery. *J Neurochem*. 2007. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x
142. Gouras GK, Tampellini D, Takahashi RH, Capetillo-Zarate E. Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2010. doi:10.1007/s00401-010-0679-9
143. Bayer TA, Wirths O. Intracellular accumulation of amyloid-beta - A predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2010. doi:10.3389/fnagi.2010.00008
144. Hane FT, Lee BY, Leonenko Z. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. *J Alzheimer's Dis*. 2017. doi:10.3233/JAD-160882
145. 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. doi:10.1007/s00401-006-0127-z
146. Laws KR, Irvine K, Gale TM. Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry*. 2016. doi:10.5498/wjp.v6.i1.54
147. Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers. *Alzheimer's Dis Int London, UK*. 2018.
148. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am*. 2019. doi:10.1016/j.mcna.2018.10.009
149. Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, et al. Cerebrospinal fluid β -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol*. 2009. doi:10.1001/archneurol.2008.596
150. Rowe CC, Ng S, Ackermann U, et al. Imaging β -amyloid burden in aging and dementia. *Neurology*. 2007. doi:10.1212/01.wnl.0000261919.22630.ea
151. Jagust W, Reed B, Mungas D, Ellis W, DeCarli C. What does fluorodeoxyglucose PET imaging add to a clinical diagnosis of dementia? *Neurology*. 2007. doi:10.1212/01.wnl.0000269790.05105.16
152. Lloret A, Esteve D, Lloret MA, et al. When does Alzheimer's disease really start? The role of biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2019. doi:10.3390/ijms20225536
153. Fiandaca MS, Mapstone ME, Cheema AK, Federoff HJ. The critical need for defining preclinical biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2014. doi:10.1016/j.jalz.2014.04.015

154. Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2006. doi:10.1093/brain/awl269
155. Maruyama M, Shimada H, Suhara T, et al. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron*. 2013. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.037
156. Leuzy A, Chiotis K, Lemoine L, et al. Tau PET imaging in neurodegenerative tauopathies—still a challenge. *Mol Psychiatry*. 2019. doi:10.1038/s41380-018-0342-8
157. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2018. doi:10.1016/j.jalz.2018.02.018
158. Jack CR, Thorneau TM, Weigand SD, et al. Prevalence of Biologically vs Clinically Defined Alzheimer Spectrum Entities Using the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Research Framework. *JAMA Neurol*. 2019. doi:10.1001/jamaneurol.2019.1971
159. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, 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 Dement*. 2011. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.003
160. Stoiljkovic M, Horvath TL, Hajós M. Therapy for Alzheimer's disease: Missing targets and functional markers? *Ageing Res Rev*. 2021. doi:10.1016/j.arr.2021.101318
161. 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. doi:10.1016/j.lfs.2021.119129
162. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al. Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008. doi:10.1016/S0140-6736(08)61075-2
163. Coric V, Van Dyck CH, Salloway S, 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. doi:10.1001/archneurol.2012.2194
164. Dodel R, Rominger A, Bartenstein P, et al. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: A phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol*. 2013. doi:10.1016/S1474-4422(13)70014-0
165. Bittar A, Bhatt N, Kaye R. Advances and considerations in AD tau-targeted immunotherapy. *Neurobiol Dis*. 2020. doi:10.1016/j.nbd.2019.104707
166. 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. doi:10.1186/s13104-018-3757-z

167. Liu Y, Lee MK, James MM, et al. Passive (Amyloid- β Immunotherapy attenuates monoaminergic axonal degeneration in the A β PPswe/PS1dE9 mice. *J Alzheimer's Dis.* 2011. doi:10.3233/JAD-2010-101602
168. Camboni M, Wang CM, Miranda C, et al. Active and passive immunization strategies based on the SDPM1 peptide demonstrate pre-clinical efficacy in the APPswePSEN1dE9 mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2014. doi:10.1016/j.nbd.2013.09.001
169. Kastanenka K V., Bussiere T, Shakerdige N, et al. Immunotherapy with aducanumab restores calcium homeostasis in Tg2576 mice. *J Neurosci.* 2016. doi:10.1523/JNEUROSCI.2080-16.2016
170. Bohrmann B, Baumann K, Benz J, et al. Gantenerumab: A novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *J Alzheimer's Dis.* 2012. doi:10.3233/JAD-2011-110977
171. Howard R, Liu KY. Questions EMERGE as Biogen claims aducanumab turnaround. *Nat Rev Neurol.* 2020. doi:10.1038/s41582-019-0295-9
172. Sperling RA, Jack CR, Black SE, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's Dement.* 2011. doi:10.1016/j.jalz.2011.05.2351
173. Salloway S, Sperling R, Fox NC, et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2014. doi:10.1056/nejmoa1304839
174. 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. doi:10.3389/fneur.2015.00207
175. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2016. doi:10.1016/j.cell.2015.12.056
176. Greenberg SM, Salman RAS, Biessels GJ, et al. Outcome markers for clinical trials in cerebral amyloid angiopathy. *Lancet Neurol.* 2014. doi:10.1016/S1474-4422(14)70003-1
177. 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. doi:10.1038/s41582-019-0281-2
178. Iturria-Medina Y, Sotero RC, Toussaint PJ, et al. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun.* 2016. doi:10.1038/ncomms11934
179. Cordonnier C, Van Der Flier WM, Sluimer JD, Leys D, Barkhof F, Scheltens P. Prevalence and severity of microbleeds in a memory clinic setting. *Neurology.* 2006. doi:10.1212/01.wnl.0000210535.20297.ae

180. Pettersen JA, Sathiyamoorthy G, Gao FQ, et al. Microbleed topography, leukoaraiosis, and cognition in probable Alzheimer disease from the sunnybrook dementia study. *Arch Neurol*. 2008. doi:10.1001/archneur.65.6.790
181. Fotiadis P, van Rooden S, van der Grond J, et al. Cortical atrophy in patients with cerebral amyloid angiopathy: A case-control study. *Lancet Neurol*. 2016. doi:10.1016/S1474-4422(16)30030-8
182. Gravina SA, Ho L, Eckman CB, et al. Amyloid β Protein (A β) in Alzheimer's Disease Brain. *J Biol Chem*. 1995. doi:10.1074/jbc.270.13.7013
183. Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, et al. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun*. 2017. doi:10.1186/s40478-017-0477-x
184. Revesz T, Holton JL, Lashley T, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol*. 2009;118(2):321-321. doi:10.1007/s00401-009-0555-7
185. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol*. 2011;70(6):871-880. doi:10.1002/ana.22516
186. Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques - An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol*. 1982. doi:10.1007/BF00685397
187. Kalaria RN, Grahovac I. Serum amyloid P immunoreactivity in hippocampal tangles, plaques and vessels: implications for leakage across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1990. doi:10.1016/0006-8993(90)90941-4
188. Snow AD, Mar H, Nochlin D, et al. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1988.
189. Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1996. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66062429.x
190. Fryer JD, Simmons K, Parsadanian M, et al. Human apolipoprotein E4 alters the amyloid- β 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci*. 2005. doi:10.1523/JNEUROSCI.5170-04.2005
191. Xiong F, Ge W, Ma C. Quantitative proteomics reveals distinct composition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2019. doi:10.1016/j.jalz.2018.10.006
192. Drummond E, Nayak S, Faustin A, et al. Proteomic differences in amyloid plaques in rapidly progressive and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2017. doi:10.1007/s00401-017-1691-0
193. Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, et al. Apolipoprotein E and clusterin inhibit the

- early phase of amyloid- β aggregation in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2019. doi:10.1186/s40478-019-0662-1
194. Manousopoulou A, Gatherer M, Smith C, et al. 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(6):492-504. doi:10.1111/nan.12342
 195. Hondius DC, Eigenhuis KN, Morrema THJ, et al. Proteomics analysis identifies new markers associated with capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):46. doi:10.1186/s40478-018-0540-2
 196. Jäkel L, Kuiperij HB, Gerding LP, et al. Disturbed balance in the expression of MMP9 and TIMP3 in cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral haemorrhage. *Acta Neuropathol Commun.* 2020. doi:10.1186/s40478-020-00972-z
 197. Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, et al. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 2017;134(4):605-617. doi:10.1007/s00401-017-1720-z
 198. Cortes-Canteli M, Paul J, Norris EH, et al. Fibrinogen and β -Amyloid Association Alters Thrombosis and Fibrinolysis: A Possible Contributing Factor to Alzheimer's Disease. *Neuron.* 2010. doi:10.1016/j.neuron.2010.05.014
 199. Jäkel L, Van Nostrand WE, Nicoll JAR, Werring DJ, Verbeek MM. Animal models of cerebral amyloid angiopathy. *Clin Sci.* 2017. doi:10.1042/CS20170033
 200. Gatti L, Tinelli F, Scelzo E, et al. Understanding the pathophysiology of cerebral amyloid angiopathy. *Int J Mol Sci.* 2020. doi:10.3390/ijms21103435
 201. Myers A, McGonigle P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Neurosci.* 2019. doi:10.1002/cpns.81
 202. LaFerla FM, Green KN. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012. doi:10.1101/cshperspect.a006320
 203. Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, et al. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J.* 2017. doi:10.15252/embj.201797397
 204. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017. doi:10.1007/s00401-016-1662-x
 205. Schaeffer EL, Figueiró M, Gattaz WF. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics.* 2011. doi:10.1590/S1807-59322011001300006
 206. Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, et al. A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci.* 2004. doi:10.1038/nn1302
 207. Davis J, Xu F, Deane R, 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. *J Biol*

Chem. 2004. doi:10.1074/jbc.M312946200

208. Dorpe J V., Smeijers L, Dewachter I, et al. Prominent cerebral amyloid angiopathy in transgenic mice overexpressing the London mutant of human APP in neurons. *Am J Pathol.* 2000. doi:10.1016/s0002-9440(10)64644-5
209. Klohs J, Deistung A, Schweser F, et al. Detection of cerebral microbleeds with quantitative susceptibility mapping in the ArcAbeta mouse model of cerebral amyloidosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011. doi:10.1038/jcbfm.2011.118
210. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (80-).* 1996. doi:10.1126/science.274.5284.99
211. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. doi:10.1073/pnas.94.24.13287
212. Klohs J, Baltes C, Princz-Kranz F, et al. Contrast-enhanced magnetic resonance microangiography reveals remodeling of the cerebral microvasculature in transgenic ArcA β mice. *J Neurosci.* 2012. doi:10.1523/JNEUROSCI.5626-11.2012
213. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
214. Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney AL, et al. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. doi:10.1073/pnas.96.24.14088
215. Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* ; 2000. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06915.x
216. Kokjohn TA, Roher AE. Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: Understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimer's Dement.* 2009. doi:10.1016/j.jalz.2009.03.002
217. Eede P, Obst J, Benke E, et al. Interleukin-12/23 deficiency differentially affects pathology in male and female Alzheimer's disease-like mice. *EMBO Rep.* 2020. doi:10.15252/embr.201948530
218. Snellman A, López-Picón FR, Rokka J, et al. Longitudinal amyloid imaging in mouse brain with 11C-PIB: Comparison of APP23, Tg2576, and APPswe-PS1dE9 mouse models of Alzheimer disease. *J Nucl Med.* 2013. doi:10.2967/jnumed.112.110163
219. López-Picón FR, Snellman A, Eskola O, et al. Neuroinflammation appears early on PET imaging and then plateaus in a mouse model of Alzheimer disease. *J Nucl Med.* 2018. doi:10.2967/jnumed.117.197608

220. Maia LF, Kaeser SA, Reichwald J, et al. Changes in amyloid- β and tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Sci Transl Med*. 2013. doi:10.1126/scitranslmed.3006446
221. Shang J, Yamashita T, Zhai Y, et al. Strong Impact of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Neurovascular Unit, Cerebrovascular Remodeling, and Neurovascular Trophic Coupling in Alzheimer's Disease Model Mouse. *J Alzheimer's Dis*. 2016. doi:10.3233/JAD-151126
222. De Retana SF, Marazuela P, Solé M, et al. Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin modulates brain beta-amyloid levels in APP23 mice. *Alzheimer's Res Ther*. 2019;11(1). doi:10.1186/s13195-019-0498-8
223. Beckmann N, Doelemeyer A, Zurbrugg S, et al. Longitudinal noninvasive magnetic resonance imaging of brain microhemorrhages in BACE inhibitor-treated APP transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2016. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.009
224. Reuter B, Venus A, Heiler P, 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. doi:10.3389/fnagi.2016.00170
225. Winkler DT, Bondolfi L, Herzig MC, et al. Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neurosci*. 2001. doi:10.1523/jneurosci.21-05-01619.2001
226. Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, et al. Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2003. doi:10.1016/S0197-4580(02)00098-2
227. Richard BC, Kurdakova A, Baches S, Bayer TA, Weggen S, Wirths O. Gene dosage dependent aggravation of the neurological phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2015. doi:10.3233/JAD-143120
228. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027
229. Torres M, Price SL, Fiol-Deroque MA, et al. Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosahexaenoic acid on Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2014. doi:10.1016/j.bbamem.2013.12.016
230. Giannoni P, Arango-Lievano M, Neves I Das, et al. Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2016. doi:10.1016/j.nbd.2016.01.001
231. Cacciottolo M, Christensen A, Moser A, et al. The APOE4 allele shows opposite sex bias in microbleeds and Alzheimer's disease of humans and mice. *Neurobiol Aging*. 2016. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.010
232. Cacciottolo M, Morgan TE, Finch CE. Age, sex, and cerebral microbleeds in EFAD

- Alzheimer disease mice. *Neurobiol Aging*. 2021. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2021.02.020
233. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *Am J Roentgenol*. 1987. doi:10.2214/ajr.149.2.351
234. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, 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 Dement*. 2011. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
235. Riba-Llena I, Jarca CI, Mundet X, et al. Investigating silent strokes in hypertensives: a magnetic resonance imaging study (ISSYS): rationale and protocol design. *BMC Neurol*. 2013;13(1):130. doi:10.1186/1471-2377-13-130
236. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*. 2014. doi:10.1016/S1474-4422(14)70090-0
237. Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002. doi:10.1093/jnen/61.3.282
238. Greenberg SM, Vonsattel JPG. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke*. 1997. doi:10.1161/01.STR.28.7.1418
239. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2012. doi:10.1016/j.jalz.2011.10.007
240. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991. doi:10.1212/wnl.41.4.479
241. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001. doi:10.1006/meth.2001.1262
242. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008. doi:10.1038/nprot.2008.73
243. Farid K, Charidimou A, Baron JC. Amyloid positron emission tomography in sporadic cerebral amyloid angiopathy: A systematic critical update. *NeuroImage Clin*. 2017. doi:10.1016/j.nicl.2017.05.002
244. Fernández-de Retana S, Montañaola A, Marazuela P, et al. Intravenous treatment with human recombinant ApoA-I Milano reduces beta amyloid cerebral deposition in the APP23-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2017;60. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.028
245. Pugh PL, Richardson JC, Bate ST, Upton N, Sunter D. Non-cognitive behaviours in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2007.

doi:10.1016/j.bbr.2006.11.044

246. Rae EA, Brown RE. The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.09.002
247. Westmark CJ, Westmark PR, Malter JS. Alzheimer's disease and down syndrome rodent models exhibit audiogenic seizures. *J Alzheimer's Dis.* 2010. doi:10.3233/JAD-2010-100087
248. Bundy JL, Vied C, Badger C, Nowakowski RS. Sex-biased hippocampal pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: A multi-omic analysis. *J Comp Neurol.* 2019. doi:10.1002/cne.24551
249. Scheyer O, Rahman A, Hristov H, et al. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2018. doi:10.14283/jpad.2018.34
250. Barnes LL, Wilson RS, Bienias JL, Schneider JA, Evans DA, Bennett DA. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Arch Gen Psychiatry.* 2005. doi:10.1001/archpsyc.62.6.685
251. Corder EH, Ghebremedhin E, Taylor MG, Thal DR, Ohm TG, Braak H. The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: Modification by age, sex, and APOE polymorphism. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* ; 2004. doi:10.1196/annals.1297.005
252. Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, et al. Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimer's Dement.* 2018. doi:10.1016/j.jalz.2018.04.008
253. Medeiros ADM, Silva RH. Sex Differences in Alzheimer's Disease: Where Do We Stand? *J Alzheimer's Dis.* 2019. doi:10.3233/JAD-180213
254. Fisher DW, Bennett DA, Dong H. Sexual dimorphism in predisposition to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2018. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.04.004
255. Manson JAE, Aragaki AK, Rossouw JE, et al. Menopausal hormone therapy and long-term all-cause and cause-specific mortality: The Women's Health Initiative randomized trials. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017. doi:10.1001/jama.2017.11217
256. Savolainen-Peltonen H, Rahkola-Soisalo P, Hoti F, et al. Use of postmenopausal hormone therapy and risk of Alzheimer's disease in Finland: Nationwide case-control study. *BMJ.* 2019. doi:10.1136/bmj.l665
257. Rosario ER, Carroll J, Pike CJ. Testosterone regulation of Alzheimer-like neuropathology in male 3xTg-AD mice involves both estrogen and androgen pathways. *Brain Res.* 2010. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.068
258. Lau CF, Ho YS, Hung CHL, et al. Protective effects of testosterone on presynaptic terminals against oligomeric β -amyloid peptide in primary culture of hippocampal neurons. *Biomed Res Int.* 2014. doi:10.1155/2014/103906

259. Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, Barron AM. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2009. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.015
260. Herzig MC, Van Nostrand WE, Jucker M. Mechanism of cerebral beta-amyloid angiopathy: murine and cellular models. *Brain Pathol.* 2006. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.tb00560.x
261. Xu F, Kotarba AME, Ou-Yang MH, et al. Early-onset formation of parenchymal plaque amyloid abrogates cerebral microvascular amyloid accumulation in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2014. doi:10.1074/jbc.M113.536565
262. Beckmann N, Schuler A, Mueggler T, et al. Age-dependent cerebrovascular abnormalities and blood flow disturbances in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2003. doi:10.1523/jneurosci.23-24-08453.2003
263. Verbeek MM, Otte-Höller I, Veerhuis R, Ruiters DJ, De Waal RMW. Distribution of A β -associated proteins in cerebrovascular amyloid of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1998. doi:10.1007/s004010050944
264. 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. doi:10.3389/fneur.2019.00187
265. Ni YQ, Zhan JK, Liu YS. Roles and mechanisms of MFG-E8 in vascular aging-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2020. doi:10.1016/j.arr.2020.101176
266. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science (80-).* 2004;304(5674):1147-1150. doi:10.1126/science.1094359
267. Fuller AD, Van Eldik LJ. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(4):246-256. doi:10.1007/s11481-008-9118-2
268. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature.* 2002;417(6885):182-187. doi:10.1038/417182a
269. Xiao Y, Li G, Chen Y, et al. Milk fat globule-epidermal growth factor-8 pretreatment attenuates apoptosis and inflammation via the integrin- β 3 pathway after surgical brain injury in rats. *Front Neurol.* 2018;9(FEB):1-11. doi:10.3389/fneur.2018.00096
270. Huang W, Wu J, Yang H, et al. Milk fat globule-EGF factor 8 suppresses the aberrant immune response of systemic lupus erythematosus-derived neutrophils and associated tissue damage. *Cell Death Differ.* 2017. doi:10.1038/cdd.2016.115
271. Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, et al. MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing. *Am J Pathol.* 2014;184(7):1981-1990. doi:10.1016/j.ajpath.2014.03.017
272. Boddart J, Kinugawa K, Lambert JC, et al. Evidence of a role for lactadherin in

- Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2007;170(3):921-929. doi:10.2353/ajpath.2007.060664
273. Li E, Noda M, Doi Y, et al. The neuroprotective effects of milk fat globule-EGF factor 8 against oligomeric amyloid β toxicity. *J Neuroinflammation.* 2012;9(1):636. doi:10.1186/1742-2094-9-148
274. Deroide N, Li X, Lerouet D, et al. MFG8 inhibits inflammasome-induced IL-1 β production and limits postischemic cerebral injury. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1176-1181. doi:10.1172/JCI65167
275. Choi J II, Kang HY, Han C, Woo DH, Kim JH, Park DH. Milk fat globule-epidermal growth factor VIII ameliorates brain injury in the subacute phase of cerebral ischemia in an animal model. *J Korean Neurosurg Soc.* 2020;63(2-163 170):163-170. doi:10.3340/jkns.2019.0188
276. Gao YY, Zhang ZH, Zhuang Z, et al. Recombinant milk fat globule-EGF factor-8 reduces apoptosis via integrin β 3/FAK/PI3K/AKT signaling pathway in rats after traumatic brain injury. *Cell Death Dis.* 2018. doi:10.1038/s41419-018-0939-5
277. Gao YY, Tao T, Wu D, et al. MFG-E8 attenuates inflammation in subarachnoid hemorrhage by driving microglial M2 polarization. *Exp Neurol.* 2021. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113532
278. Chiang HY, Chu PH, Lee TH. MFG-E8 mediates arterial aging by promoting the proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):1-14. doi:10.1186/s12929-019-0559-0
279. Wang M, Wang H, Lakatta E. Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor VIII Signaling in Arterial Wall Remodeling. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(5):768-776. doi:10.2174/1570161111311050014
280. Fu Z, Wang M, Gucek M, et al. Milk fat globule protein epidermal growth factor-8: A pivotal relay element within the angiotensin II and monocyte chemoattractant protein-1 signaling cascade mediating vascular smooth muscle cells invasion. *Circ Res.* 2009. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.187088
281. Yamaguchi H, Takagi J, Miyamae T, et al. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol.* 2008. doi:10.1189/jlb.1107730
282. Yamamoto N, Yamaguchi H, Ohmura K, et al. Serum milk fat globule epidermal growth factor 8 elevation may subdivide systemic lupus erythematosus into two pathophysiologically distinct subsets. *Lupus.* 2014. doi:10.1177/0961203314523870
283. Kishi C, Motegi SI, Ishikawa O. Elevated serum MFG-E8 level is possibly associated with the presence of high-intensity cerebral lesions on magnetic resonance imaging in patients with systemic lupus erythematosus. *J Dermatol.* 2017;44(7):783-788. doi:10.1111/1346-8138.13791
284. Seppälä TT, Nerg O, Koivisto AM, et al. CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology.* 2012. doi:10.1212/WNL.0b013e3182563bd0

285. Davis J, Van Nostrand WE. Enhanced pathologic properties of Dutch-type mutant amyloid β -protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. doi:10.1073/pnas.93.7.2996
286. Previti M Lou, Zhang W, Van Nostrand WE. Dexamethasone diminishes the pro-inflammatory and cytotoxic effects of amyloid β -protein in cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neuroinflammation*. 2006. doi:10.1186/1742-2094-3-18
287. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(4):265-277. doi:10.1038/nrn3468
288. Chu H, Huang C, Ding H, et al. Aquaporin-4 and cerebrovascular diseases. *Int J Mol Sci*. 2016:1-15. doi:10.3390/ijms17081249
289. Lan Y-L, Zhao J, Ma T, Li S. The Potential Roles of Aquaporin 4 in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2016;53(8):5300-5309. doi:10.1007/s12035-015-9446-1
290. Abbott NJ, Pizzo ME, Preston JE, Janigro D, Thorne RG. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS : is there a 'glymphatic' system ? *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):387-407. doi:10.1007/s00401-018-1812-4
291. Rosu GC, Catalin B, Balseanu TA, et al. Inhibition of Aquaporin 4 Decreases Amyloid A β 40 Drainage Around Cerebral Vessels. *Mol Neurobiol*. 2020. doi:10.1007/s12035-020-02044-8
292. Owasil R, O'Neill R, Keable A, et al. The pattern of AQP4 expression in the ageing human brain and in cerebral amyloid angiopathy. *Int J Mol Sci*. 2020. doi:10.3390/ijms21041225
293. Debette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010. doi:10.1136/bmj.c3666
294. Fan Y, Liu M, Wu X, et al. Aquaporin-4 promotes memory consolidation in Morris water maze. *Brain Struct Funct*. 2013. doi:10.1007/s00429-011-0373-2
295. Skucas VA, Mathews IB, Yang J, et al. Impairment of select forms of spatial memory and neurotrophin-dependent synaptic plasticity by deletion of glial aquaporin-4. *J Neurosci*. 2011. doi:10.1523/JNEUROSCI.6249-10.2011
296. Zhang J, Li Y, Chen ZG, et al. Glia protein aquaporin-4 regulates aversive motivation of spatial memory in morris water maze. *CNS Neurosci Ther*. 2013. doi:10.1111/cns.12191
297. Xu Z, Xiao N, Chen Y, et al. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener*. 2015. doi:10.1186/s13024-015-0056-1
298. Abe Y, Ikegawa N, Yoshida K, et al. Behavioral and electrophysiological evidence for a neuroprotective role of aquaporin-4 in the 5xFAD transgenic mice model. *Acta Neuropathol Commun*. 2020. doi:10.1186/s40478-020-00936-3
299. Tang Y, Wu P, Su J, Xiang J, Cai D, Dong Q. Effects of Aquaporin-4 on edema formation following intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol*. 2010. doi:10.1016/j.expneurol.2010.01.015

300. Chu H, Xiang J, Wu P, et al. The role of aquaporin 4 in apoptosis after intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2014. doi:10.1186/s12974-014-0184-5
301. Appelboom G, Bruce S, Duren A, et al. Aquaporin-4 gene variant independently associated with oedema after intracerebral haemorrhage. *Neurol Res*. 2015. doi:10.1179/1743132815Y.0000000047
302. Dardiotis E, Siokas V, Marogianni C, et al. AQP4 tag SNPs in patients with intracerebral hemorrhage in Greek and Polish population. *Neurosci Lett*. 2019. doi:10.1016/j.neulet.2018.12.025
303. O'Donnell HC, Rosand J, Knudsen KA, et al. Apolipoprotein E Genotype and the Risk of Recurrent Lobar Intracerebral Hemorrhage. *N Engl J Med*. 2000. doi:10.1056/nejm200001273420403
304. Brouwers HB, Biffi A, McNamara KA, et al. Apolipoprotein e genotype is associated with ct angiography spot sign in lobar intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2012. doi:10.1161/STROKEAHA.112.659094
305. Nicchia GP, Nico B, Camassa LMA, et al. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: Studies in animal and cell culture models. *Neuroscience*. 2004. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.07.055
306. Saadoun S, Tait MJ, Reza A, et al. AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience*. 2009. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.069
307. Zhou J, Kong H, Hua X, Xiao M, Ding J, Hu G. Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport*. 2008. doi:10.1097/WNR.0b013e3282f2b4eb
308. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, et al. Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Sci*. 2001.
309. Chu H, Tang Y, Dong Q. Protection of granulocyte-colony stimulating factor to hemorrhagic brain injuries and its involved mechanisms: Effects of vascular endothelial growth factor and aquaporin-4. *Neuroscience*. 2014. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.12.017
310. Ramiro L, Simats A, Penalba A, et al. Circulating Aquaporin-4 as A biomarker of early neurological improvement in stroke patients: A pilot study. *Neurosci Lett*. 2020. doi:10.1016/j.neulet.2019.134580