





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>



**IDENTIFICACIÓN DE
BIOMARCADORES
EN EL ICTUS
HEMORRÁGICO
Y SU ESTUDIO FUNCIONAL
EN MODELOS
EXPERIMENTALES**

CRISTINA MERINO ZAMORANO

**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS (INc)
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

Directores:

**DRA. MAR HERNÁNDEZ GUILLAMON
DR. JOAN MONTANER VILLALONGA**

Tutor:

Dr. José Rodríguez Álvarez

TESIS DOCTORAL

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN EL ICTUS
HEMORRÁGICO Y SU ESTUDIO FUNCIONAL EN
MODELOS EXPERIMENTALES**

CRISTINA MERINO ZAMORANO

**DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS (INc)
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA (UAB)**

Directores:

**DRA. MAR HERNÁNDEZ GUILLAMON
DR. JOAN MONTANER VILLALONGA**

Tutor:

Dr. José Rodríguez Álvarez

Barcelona, 2016

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación Neurovascular (LIN) del Institut de Recerca Vall d'Hebron con el soporte de la ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) del Instituto de Salud Carlos III (FI12/00089).

El Laboratorio de Investigación Neurovascular pertenece a la Red Española de Investigación Neurovascular INVICTUS (RD12/0014/0005) y recibe financiación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (CP12/03259 y PII14/01134) y de la Fundació de la Marató de TV3 (40/U/2014).

Los estudios presentados a continuación han sido realizados en colaboración con el laboratorio de la Universidad francesa d'Artois, *Laboratoire Physiopathologique de la Barrière Hémato-Encéphalique* (EA 2465, Lens, Francia), y por el laboratorio de investigación Neurovascular del *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, INSEERM UNIT U919 (Caen, Francia).

Agradecimientos

“Pues no tengo ni idea de qué hacer”... Eso es lo que pensé cuando teníamos que elegir carrera y rellenar el *papeleo* de la Selectividad. Todos mis amigos tenían la vida medio organizada, sabían a qué se querían dedicar profesionalmente. Me daba envidia ver la euforia que tenían por estudiar algo por vocación. Yo no tenía ni idea de qué hacer y estaba frustrada, a pesar de que podía entrar en casi cualquier carrera, nada me *convencía*. “Haz Biotecnología y especialízate en Biomedicina o Farmacia, es el futuro. Es una pena que, con tu nota de corte y tus aptitudes, desaproveches la oportunidad...”. Eso me dijo la mejor profesora que he tenido, Isabel Bosque. “Pero Isabel, se me dan mejor las *Mates*. Biología es lo peor que llevo. Además, esa carrera parece difícil”; “Tus notas hablan por sí solas. Lo difícil te motiva. No seas insegura, elijas lo que elijas, tú eres capaz de todo”. Y así, un poco a ciegas y con miedo a no ser capaz de hacerlo (como muchas decisiones que he tomado en la vida), decidí estudiar Biotecnología. Ese fue el primer pasito del camino que me ha llevado hasta aquí, tanto en lo profesional como en lo personal ¡Qué bien me conocías Isabel!

Creía que este apartado sería el más fácil y corto de escribir. Pero me equivocaba. No es fácil plasmar en un papel la gratitud hacia la gente que ha sido partícipe en esta tesis. Y no va a ser corto... :)

Quiero dar las gracias a Joan Montaner y a Mar Hernández por dejarme formar parte del LIN. Joan, he aprendido muchísimo profesionalmente, pero sobre todo me quedo con tu optimismo. Mar, gracias por enseñarme todo lo que he aprendido y a *exprimir* lo mejor de mí. Parecía que no iba a llegar el día, ¡pero lo hemos conseguido!

A todos mis compis del LIN, por aguantar mis *neuras*. Gracias por los momentos y risas que hemos compartido. A Tere, somos el día y la noche, pero ya sabes todo lo que pienso. Espero que sigamos estando ahí, la una para la otra, y ¡que haya muchas tardes de birras y reflexiones! Victorini!, eres el mejor ejemplo de compañero que conozco. Eres una gran persona y ha sido una pasada conocerte y coincidir contigo estos años. Sé que te va a ir genial en la vida, porque ¡te lo mereces! (Me debes un abrazo de los *que corra el aire*, eh!). Mora, la más *crack* dentro y fuera del lab. Motivada, sensata y siempre dispuesta a ayudar con una sonrisa. Ya sabes que de mayor quiero ser como tú, no? Alba, sigue siendo como eres, no cambies por nada ni nadie porque eres genial en todos los sentidos. Sigue así guapa, *eres un solete*!! Marina, mi pequeña *Bohemia*! Espero que nuestros momentos *RadioPatio* sigan. Estoy

segura que seremos ricas y tendremos mayordomo ¡lo veo! Sofía, me encanta tu manera de ser y de cómo relativizas todo. Ánimo campeona, ¡puedes con todo! Álex (*empagaloso!*), te dejo de herencia mi modelo, aunque sé que hubieras preferido un boli Bic o un marker... Como te dije, me quedo con lo bueno, las mil historias en el metro, las conversaciones y los ataques de risa. Eso sí, deja de ser tan *cotilla* y cabezón por *Diorrr!* Dolors, quiero seguir sabiendo de tus historias y que me pongas al día! Gracias por los mil favores que me has hecho, siempre con una sonrisa...Aunque sigo odiando la estadística eh! MireCamposTotJunt!! Gracias por todo, por tus charlas y por entenderme cuando ni yo me entendía. Muchas veces me he sentido muy identificada contigo. *Ets un sol!* Mire Parés, por tu empatía y por la visión que tienes de la vida!

Thanks to the French team, *Physiopathologique de la Barrière Hémato-Encéphalique*, for welcoming me as one more of you. Special thanks to Fabien and Caroline for the training. Julien, Tom and Aurore, for sharing all the moments in and outside the lab.

A mi familia, en especial a mis padres y mi hermano. ¡¡¡¡Ya está, lo hemos conseguido!!!! Habéis sido un apoyo incondicional y gran parte de esta tesis es vuestra. *Ayul*, como te dije una vez, no hay un solo recuerdo feliz en el que no estés tú. Ahora me tendréis que ayudar a hacerle entender al abuelo que aunque sea “Doctora” y trabaje en Vall d’hebron no soy médico...creo que yo sola no seré capaz. A mi *abu*, por sentirse tan orgulloso de mí, por las miradas tan dulces que me regala y por sus abrazos... Los mejores abrazos, sin duda. A los que ya no están, pero sé que estarían muy orgullosos de este momento. Ojalá pudierais estar aquí para compartirlo. ¡Os echo mucho de menos! Gracias a todos, ¡os quiero! :)

A todos mis amigos. Mi segunda gran familia. Porque es fácil tener amigos en los buenos momentos. Te salen de debajo de las piedras. Lo jodido es tenerlos en los malos. Y por eso, he aprendido que nadie te quiere tanto como las personas que han visto lo peor de ti, y aun así se quedan a tu lado porque quieren hacerlo, no por ti, sino por ellos. Y esos sois vosotros.

A mis pequeñas *chinchillas* de campo: *Preguem Senyor!* Cada momento, cada pequeño detalle, ¡lo hacéis taaaan grande! Sois increíbles y la vida se disfruta mil veces más cuando estamos juntos porque “*somos diferentes, molamos demasiado*”. Quiero que nuestros viernes de birras y de risas sigan durante mucho tiempo. Después de 27 años juntos solo os puedo decir que ¡no os hacéis una idea de lo que os quiero petardos! Mire, gracias por darme tu punto de vista, por esas *intervenciones*, por hacerme recapacitar y hacerme “volver” cuando estaba tan perdida. ¡Eres tan bonita por dentro y por fuera! Ese vino blanco nos está esperando...¡pago yo!

Marta y Mari, ¡Nueva vida! Gracias por las conversaciones, consejos y apoyo que no sólo me habéis dado estos años, sino desde que era una enana (literalmente hablando) ¡Por muchos años juntas! Me encanta ver que después de tanto tiempo, seguimos estando unidas. Y por supuesto, gracias por esos *sobris* tan guapos que tengo :)

A los de *Can Rull*. En especial, Marina y Ester, gracias por estar siempre conmigo y sacar mi sensatez cuando estoy en modo *cabezona ON*. Marina, soy tan feliz cada vez que hacemos planes...¡Por el camino de Santiago y lo que venga! Ester, confío en ti! Sigue así, haz lo que más te gusta, cumple tu sueño y sé feliz... Ah! y haz la maleta...¡que te estamos esperando! Álex, la vida *son tres días y ya hemos perdido uno*, ¡preparate para la celebración! ¡Y prepara el sofá también, que como de costumbre dormiré allí! Alberto, *buuufff!* No hay espacio suficiente en esta tesis para agradecerte todo. Sencillamente eres la mejor persona que he conocido y espero seguir compartiendo muchos momentos contigo. Siempre formarás parte de mi vida, y ¡lo sabes! Parte de esta tesis, también es tuya. Ya sabes todo lo que pienso de ti, no hay mucho más que decir. *Us estimuuu!*

Lidia, *Yo no quiero a nadie que me diga que todo va a ir bien; prefiero que me miren y me digan: esto se está yendo a la mierda, pero yo me quedo*. Es la frase que mejor define nuestra amistad :) ¡Gracias por aparecer! Por tu sinceridad, por tu manera tan dulce de ver la vida, por la visión tan positiva que tienes sobre mí, por no cambiarme en nada pero hacerme mejorar en muchos sentidos, y por millones de detalles, momentos e historias que hemos vivido y viviremos. Por aceptar los planes que propongo sin pensar que estoy loca, y por tus planes *kamikaze*, ¡que tanto me gustan! Por la seguridad que nos damos la una a la otra y las ganas de vivir nuevas experiencias. Ah! Y por tu música molona que tanto me “enamora”, *amol!* Jajajaja... *Por el romantiqueoooo de los chinos, tu 100% algodón! Tatatatatatatatá! T’ailoviu petita!*

A Dani, aunque no leas esto, no podías faltar aquí. Te conocí cuando mi vida estaba del revés. Fuiste el aire fresco que necesitaba en el momento que lo necesitaba, por volver a ilusionarme con cosas que creía que no tenían sentido. Me hiciste visualizar este día, y, que si dejaba las cosas a medias, nunca me lo perdonaría. Me hiciste confiar en mí misma, me diste la seguridad que necesitaba. Después de mil conversaciones, fuiste en gran parte quién me hizo recapacitar, enfrentarme a mis *demonios* y seguir con todo esto. *Todo pasa por alguna razón*, no? Gracias.

A mis cerbatillas, las que me iniciaron en el mundo de la Biología Molecular. En especial, a *nuestra* Chari. Te fuiste demasiado pronto y de la manera más injusta (esta tesis va por ti!).

Nunca pensé que aquel viaje en Renfe sería el último momento que compartiría contigo. Me pasé el viaje malhumorada, ofuscada y quejándome por el trabajo, por el retraso de la Renfe, por aquel chico... en definitiva, por tonterías. El día que me dieron la noticia, pensé en lo injusta que era la vida (y lo ridícula que era mi manera de ser), lo poco que valoramos lo que tenemos, qué poco aprovechamos la vida y que en el momento que menos te lo esperas, todo acaba sin previo aviso. Y ya no hay oportunidad de volver atrás. Te echamos de menos.

A todos los que han formado parte de mi vida durante estos años. A los que se fueron a la fuerza; a los que ya no están en mi vida, pero les estoy agradecida porque de todos he aprendido algo; y a los que aún forman parte de mi vida (aunque no os mencione uno por uno), porque si seguís formando parte de ella es porque sois especiales para mí. Porque sumáis buenos momentos, y restáis los malos.

Por último, a todos aquellos que por desgracia han sido víctimas del Ictus. Ojalá todo el esfuerzo realizado sirva para un futuro mejor. Esa es la mayor motivación que he podido tener.

¡Gracias a todos!

Abreviaturas

AAC: Angiopatía Amiloide Cerebral

ABri: proteína Amiloide Británica (del inglés *amyloid-British protein*)

AIT: Ataque Isquémico Transitorio

AD: Proteína de Unión Adherente (del inglés *Adheren Junctions*)

ALBU: Albúmina

ANFB: BNP; del inglés *Natriureticpeptides B*

Angio-TC: Angiografía-Tomografía Computarizada

APC: Proteína C Activada (del inglés *Activated Protein C*)

API5: del inglés *Apoptosis inhibitor 5*

ApoA1: Apolipoproteína A1

ApoE: Apolipoproteína E

ApoJ: Apolipoproteína J

APP: Proteína Precursora Amiloide (del inglés *Amyloid Precursor Protein*)

AVIL: del inglés *Advillin*

A β : beta-amiloide (del inglés *Amyloid-Beta*)

A β (1-40) o A β 40: segmento de 40 aminoácidos del péptido beta-amiloide

A β (1-42) o A β 42: segmento de 42 aminoácidos del péptido beta-amiloide

B-CSFB: del inglés *Blood-cerebrospinal fluid barrier*

BCL10: del inglés *B-cell lymphoma/leukemia-10*

BHE: Barrera Hematoencefálica

CLU: del inglés *Clusterin*

CSF-1: del inglés *Colony stimulating factor 1*

CSF-2: del inglés *Colony stimulating factor 2*

DKK1: del inglés *Dickkopf-related protein 1*

EA: Enfermedad de Alzheimer

eROS: Especies Reactivas de Oxígeno

FcRn: Receptor Fc

FDA: del inglés *Food and Drug Administration*

FGF5: del inglés *Fibroblast growth factor 5*

GDNF: Factor glial neurotrófico (del inglés *glial cell derived neurotrophic factor*)

GFAP: Proteína fibrilar ácida glial (del inglés *Glial fibrillary acidic protein*)

GOLGA8A: del inglés *Golgin A8 Family Member*

HIC: Hemorragia Intracerebral

HIC-AAC: Hemorragia Intracerebral asociada a la Angiopatía Amiloide Cerebral

HIC-HTA: Hemorragia Intracerebral asociada a Hipertensión arterial

HDL: del inglés *High density lipoproteins*

hs-CRP: Proteína C Reactiva de Alta Sensibilidad (del inglés *high-sensitivity C reactive protein*)

HTA: Hipertensión arterial

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1 (del inglés *Intercellular Adhesion Molecule 1*)

ICAM-2: Molécula de adhesión intercelular 2 (del inglés *Intercellular Adhesion Molecule 2*)

IDE: Enzima de degradación de insulina (del inglés *Insulin degradation enzyme*)

IL1: Interleucina 1 (del inglés *Interleukin family 1*)

IL1- α : Interleucina 1 alpha (del inglés *Interleukin 1-alpha*)

IL6: Interleucina 6 (del inglés *Interleukin family 6*)

IL8: Interleucina 8 (del inglés *Interleukin family 8*)

LCR: Líquido cefaloraquídeo

LDL: Lipoproteínas de baja densidad (del inglés *Low Density Lipoprotein*)

LRP: Receptor de lipoproteínas (del inglés *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein*)

LRP1: Receptor 1 de lipoproteínas (del inglés *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1*)

LRP2: Receptor 2 de lipoproteínas (del inglés *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 2*)

LRP8: Receptor 8 de lipoproteínas (del inglés *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 8*)

MCAO: Oclusión de la arteria cerebral Media (del inglés *Middle cerebral artery occlusion*)

MMP: Metaloproteínasa de matriz extracelular (del inglés *Matrix MetalloProteinase*)

MMP2: Metaloproteínasa de matriz extracelular 2 (del inglés *Matrix MetalloProteinase 2*)

MMP9: Metaloproteínasa de matriz extracelular 9 (del inglés *Matrix MetalloProteinase 9*)

mRNA: RNA mensajero

mRS: escala funcional de Rankin modificada

NEDD9: del inglés *Neural precursor cell expressed 9*

NF- κ -B: Factor de transcripción nuclear Kappa-B (del inglés *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells*)

NK- κ -B2: Factor de transcripción nuclear Kappa-B, subunidad 2 (del inglés *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 2*)

NIHSS: Escala de Ictus del Instituto Nacional de Salud (del inglés *National Institute of Health Stroke Scale*)

NURR1: NR4A2 del inglés *Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*

PA: Presión Arterial

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno (del inglés *Plasminogen Activator Inhibitor 1*)

PDGF-CC: Factor de crecimiento derivado plaquetario C (del inglés *Platelet Derived Growth Factor C*)

PET: Tomografía por emisión de positrones (del inglés *Positron Emission Tomography*)

PIB: del inglés *Pittsburgh compound B*

POG: Privación de oxígeno y glucosa

PrP: Proteína Priónica (del inglés *Prion Protein*)

RAP: del inglés *Receptor-Associated Protein*

RBP4: del inglés *Retinol binding protein 4*

rFVIIa: Factor VII Activado Recombinante (del inglés *Recombinant Factor VII Activated*)

RM: Resonancia Magnética

rNMDA: receptor N-Metil-D-Aspartato

r-tPA: Activador del Plasminógeno Tisular Recombinante (del inglés *recombinanttissular plasminogen activator*)

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (del inglés *Real time quantitative Polymerase chain reaction*)

S100B: Proteína de Unión al Calcio S100 (del inglés *S100 calcium binding protein B*)

SBS: Tecnología de secuenciación por síntesis (del inglés *sequencing by synthesis technology*)

SMAD3: del inglés *SMAD Family Member 3*

SNC: Sistema Nervioso central

SNP: del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*

SSAO: Amina oxidasa sensible a la semicarbazida (del inglés *Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase*)

TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (del inglés *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*)

TC: Tomografía Computarizada

TGB-1: del inglés *Transforming Growth Factor Beta 1*

TH: Transformación hemorrágica

THBS1: del inglés *Thrombospondin 1*

TJ: Proteína de unión ocluyente (del inglés *Tight Junction*)

TNF: Factor de Necrosis Tumoral (del inglés *Tumor Necrosis Factor*)

TOAST: del inglés *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*.

tPA: Activador del Plasminógeno Tisular (del inglés *tissular plasminogen activator*)

VAP1: Proteína de Adhesión vascular 1 (del inglés *Vascular Adhesion Protein-1*)

VCAM-1: Molécula de Adhesión Celular 1 (del inglés *vascular cell adhesion molecule 1*)

Resumen

La hemorragia intracerebral (HIC) se define como la extravasación de sangre al parénquima encefálico. Aunque la HIC presenta una elevada tasa de mortalidad y discapacidad, muchos de los mecanismos moleculares implicados en esta patología aún se desconocen. Su diagnóstico y pronóstico se basa en las pruebas de neuroimagen, siendo en ocasiones poco accesibles y específicas. Por ello, el objetivo principal de esta tesis se centra en la identificación de moléculas implicadas en la patología de la HIC que pudieran emplearse en mejorar las aproximaciones diagnósticas y terapéuticas de esta enfermedad.

Por ello, la primera parte de la tesis se basó en encontrar biomarcadores de etiología de HIC primaria (arteriosclerosis hipertensiva y/o angiopatía amiloide cerebral (AAC), mediante el análisis transcriptómico de células sanguíneas. A pesar de que no fuimos capaces de identificar ningún biomarcador que diferenciara ambas etiologías, encontramos que la expresión del gen *GOLGA8A* (Golgin A8 Family, Member A), así como los niveles de la proteína en sangre, estaban incrementados en pacientes con HIC respecto a controles. En segundo lugar, nos centramos en identificar moléculas implicadas en una de las causas de HIC secundaria, como es la transformación hemorrágica (TH) en el ictus isquémico tras el tratamiento trombolítico. A pesar de la eficacia del Activador Tisular del Plasminógeno recombinante (r-tPA), el uso de esta terapia en el ictus isquémico agudo sigue limitado en parte por la estrecha ventana terapéutica y la presencia ocasional de hemorragias sintomáticas. Por ello, nuestro estudio *in vitro* se centró en la identificación masiva de transcritos expresados por el tratamiento con r-tPA en condiciones de privación de oxígeno y glucosa (POG) a nivel endotelial. Identificamos el factor de transcripción nuclear NURR1 (NR4A2, del inglés *Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*) como molécula implicada en la muerte celular y la inflamación. Además, pudimos establecer una asociación entre los niveles basales de NURR1 séricos y la posterior aparición de TH sintomática en pacientes con ictus isquémico que habían recibido r-tPA. Por último, en un tercer estudio, evaluamos cómo las apolipoproteínas ApoJ y ApoA1 recombinantes humanas modulaban el transporte del péptido β -amiloide (1-40) a través de un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica, como posible aproximación terapéutica para la AAC.

En resumen, consideramos que esta tesis doctoral contribuye a definir mejor la fisiopatología de la HIC, al desarrollo de posibles aplicaciones de diagnóstico y pronóstico de los pacientes que sufren hemorragias cerebrales, así como a proponer nuevas aproximaciones terapéuticas para diferentes subtipos de HIC.

Abstract

Intracerebral hemorrhage (ICH) is a focal bleeding from a blood vessel in the brain parenchyma. Despite the high ratio of ICH severity and mortality, the molecular mechanisms involved in this disease are still unknown. Therefore, the main objective of this thesis is focused on the identification of molecules involved in the pathology of the ICH that might be candidates for a better diagnosis, treatment and prognosis of the disease.

Primary ICH is caused by hypertensive arteriosclerosis and/or cerebral amyloid angiopathy (CAA). The diagnosis and prognosis is based on neuroimaging criteria, but these techniques remain inaccessible and not enough specific. Therefore, our first study was based on the search of biomarkers of primary ICH etiology through the transcriptome analysis of blood cells using microarray technology. Although we were unable to identify biomarkers to differentiate between CAA associated-ICH and hypertensive associated-ICH, we found that GOLGA8A (Golgin A8 Family, Member A) gene expression and the corresponding plasma protein levels were increased in patients with ICH in comparison to controls. Secondly, we aimed to identify molecules involved in a cause of secondary ICH, such as the hemorrhagic transformation (HT) in the ischemic stroke after the thrombolytic therapy. Despite the effectiveness of recombinant tissue plasminogen activator (r-tPA), its therapeutic window remains limited, mainly by occasional vascular deleterious effects. Thus, we focused our study on the discovery of molecules altered by the combination of r-tPA and ischemic conditions in endothelial cells *in vitro*. We identified the nuclear transcription factor NURR1 (NR4A2, *Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*) as a candidate molecule involved in cell death and inflammation. In addition, we established an association between baseline serum levels of NURR1 and the subsequent development of symptomatic HT in patients with ischemic stroke who received r-tPA. Finally, in a third study, we planned to determine the modulation of β -amyloid ($A\beta$) trafficking by the chaperones apolipoproteins ApoA1 and ApoJ across the BBB. In this regard, we confirmed that both recombinant human ApoA1 and ApoJ proteins influenced the $A\beta$ (40) clearance through different mechanisms in a mouse *in vitro* BBB model. Our results suggest that the modulation of the balance of these apolipoproteins between the periphery and the brain may be a future strategy to develop an effective therapy for CAA.

In summary, we consider that our studies contribute to the understanding of some mechanism involved in the ICH pathology and propose new preclinical and therapeutic approaches for different ICH subtypes.

Índice

Agradecimientos

Abreviaturas

Resumen

Abstract

I. INTRODUCCIÓN 23

Capítulo 1. La hemorragia intracerebral 25

1.1. El ictus 25

1.2. Ictus hemorrágico..... 25

1.2.1. La hemorragia intracerebral 25

1.2.2. Diagnóstico de la HIC26

1.2.3. Pronóstico de la HIC..... 27

1.2.4. Tratamiento de la HIC 28

1.2.5. Inflamación y respuesta celular tras la HIC..... 29

1.2.6. La HIC primaria..... 31

1.2.6.1. Definición y etiología 31

1.2.6.1.1 Hipertensiva (HIC-HTA) 31

1.2.6.1.2 Angiopatía Amiloide Cerebral (HIC-AAC) 32

1.2.6.2. Biomarcadores de la HIC primaria 34

1.2.7. HIC secundaria..... 35

Capítulo 2. Transformación hemorrágica asociado al tratamiento trombolítico en el ictus isquémico..... 37

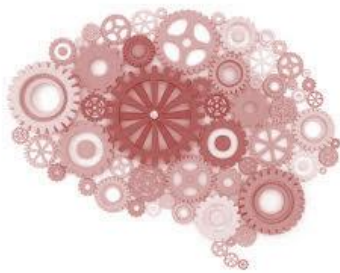
2.1. Ictus isquémico..... 37

2.2 Fármacos trombolíticos: r-tPA 37

2.3 Transformación hemorrágica asociada a tratamiento trombolítico..... 39

2.4. Mecanismos moleculares implicados en la toxicidad del r-tPA	40
2.4.1. Disrupción de la BHE por r-tPA	42
2.4.2. Excitotoxicidad.....	43
2.4.3. Inflamación periférica y neuroinflamación: infiltración de leucocitos	43
2.5. Biomarcadores de TH	44
Capítulo 3. Transporte Aβ a través de la BHE.....	46
3.1. Depósito de β -Amiloide cerebral	46
3.1.1. Péptido β -amiloide (A β)	46
3.1.2. Síntesis A β	48
3.1.3. Eliminación de A β cerebral	48
3.2. La barrera hematoencefálica	50
3.3. Transporte de A β a nivel de BHE	52
3.3.1. Apolipoproteínas (ApoE, ApoJ y ApoA-I) y su relación con el transporte y metabolismo de A β	55
II. OBJETIVOS.....	59
III. RESULTADOS.....	63
ARTÍCULO 1:	
Identification of Plasma Biomarkers of Human Intracerebral Hemorrhage Subtypes through Microarray Technology. <i>J Stroke Cerebrovasc Dis.</i> 2016;25(3):665-71.....	65
ARTÍCULO 2:	
NURR1 Involvement in Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment Complications After Ischemic Stroke. <i>Stroke.</i> 2015 Feb;46(2):477-84.....	77
ARTÍCULO 3:	
Modulation of beta-amyloid(1-40) transport by ApoA1 and ApoJ across an in vitro model of the blood-brain barrier (submitted <i>in Journal of Alzheimer's Disease</i> , under review)	95

IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	123
1.Revisión sistemática de biomarcadores de la ICH primaria hasta la actualidad	125
2.Moléculas implicadas en la patología de HIC primaria: biomarcadores de etiología	128
2.1. Búsqueda de biomarcadores hemorrágicos por tecnología de microarrays	128
2.2. GOLGA8A, ¿es un buen biomarcador de HIC primaria?	130
3. Identificación de nuevas moléculas implicadas en la HIC secundaria asociada al tratamiento trombolítico en el ictus isquémico	131
3.1. Uso de modelos <i>in vitro</i> para la búsqueda de biomarcadores de complicaciones asociadas al r-tPA en el ictus isquémico.....	132
3.2. Análisis transcriptómico por la tecnología de microarrays	133
3.3. NURR1 como marcador de daño endotelial.....	134
3.4. Utilidad clínica de la determinación de Nurr1 como biomarcador pronóstico de complicaciones hemorrágicas	137
4. Rol de las Apolipoproteínas en la amiloidosis cerebral	138
4.1. Modelaje de la BHE in vitro: una herramienta preclínica para el estudio de AAC y la Enfermedad del Alzheimer	138
4.2. Apo1 y ApoJ, ¿proteínas moduladoras de la acumulación de A β ?.....	140
V. CONCLUSIONES	145
VI. ANEXO	149
VII. BIBLIOGRAFÍA	155



Introducción

Capítulo 1. La hemorragia intracerebral

1.1. El ictus

El ictus se define como un trastorno en una zona del parénquima encefálico causado por una alteración en el flujo sanguíneo. Como consecuencia, pueden aparecer una serie de síntomas neurológicos tales como: afasia (trastorno del lenguaje), hemiparesia (afectación de la capacidad motora de un lado del cuerpo), hemihipoestesia (alteración de la sensibilidad de un lado del cuerpo), pérdida de conciencia, vértigo o pérdida de visión, entre otros. Podemos distinguir dos tipos de ictus; el ictus isquémico, resultado de la obstrucción de un vaso interrumpiendo el flujo sanguíneo, o bien, el ictus hemorrágico, como consecuencia de la rotura de un vaso del interior de la cavidad craneal.

El ictus es la segunda causa de muerte y la causa más común de invalidez en adultos en todo el mundo (Díaz-Guzmán et al., 2012). Los datos de incidencia de ictus en la sociedad española son alarmantes desde el punto de vista sociosanitario y económico. La incidencia del ictus en nuestra sociedad es de 187 casos por cada 100.000 habitantes, donde en el 92% de los casos se requiere de la hospitalización del paciente y la mortalidad intrahospitalaria se produce en un 12% (Díaz-Guzmán et al., 2012). De todos ellos, el 67% de los ictus que se producen son isquémicos, 15% hemorrágicos y el resto ataques isquémicos transitorios (AIT) o de causa indeterminada. Independientemente del sexo (47% mujeres), el ratio de incidencia del ictus incrementa con la edad en ambos casos (Díaz-Guzmán et al., 2012). Aunque la gravedad y el porcentaje de mortalidad del ictus hemorrágico son mayores que en el ictus isquémico, este tipo de ictus es el menos estudiado y los mecanismos moleculares que intervienen en su fisiopatología aún no se conocen bien (Montaner, 2005; Wang, 2010; Zhou et al., 2014). En este sentido, parte de la presente tesis se centrará en la búsqueda de moléculas implicadas en los mecanismos subyacentes a la fisiopatología de la hemorragia intracerebral (HIC) primaria y de la HIC secundaria asociada al tratamiento trombolítico en el ictus isquémico.

1.2. Ictus hemorrágico

1.2.1. La hemorragia intracerebral

El ictus hemorrágico puede dividirse en 5 categorías en función de la localización del sangrado: hemorragia intracerebral (HIC), hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, y hematomas subdural y extradural. La HIC ocurre cuando se rompe un vaso sanguíneo debilitado y como consecuencia se produce la extravasación espontánea de sangre en el

parénquima cerebral. La HIC es la causante del 15-20% de todos los ictus y afecta a unos 12-14 casos por cada 100.000 habitantes a nivel mundial (Godoy et al., 2012).

Como veremos más adelante, la HIC puede clasificarse en dos tipos según su origen, primaria o secundaria. La HIC primaria es causada por la ruptura espontánea de los vasos dañados por arteriosclerosis hipertensiva (hipertensión arterial (HTA) o por angiopatía amiloide cerebral (AAC). La HIC secundaria se produce generalmente por otras causas, como malformaciones vasculares, neoplasias, traumatismos o coagulopatía.

Independientemente del origen, la extravasación de sangre al parénquima produce una compresión del tejido cerebral adyacente, provocando así un incremento de la presión intracraneal. Los factores de riesgo que se han asociado a la HIC, además de la HTA y AAC, son la edad avanzada, uso de anticoagulantes, leucaraiosis, precedentes de ictus, patologías hematológicas, enfermedad renal crónica, traumatismo, aneurisma, malformaciones vasculares, consumo de alcohol y drogas y niveles bajos de colesterol, entre otros (Aguilar y Brott, 2011).

1.2.2. Diagnóstico de la HIC

Para la realización del diagnóstico del ictus, por un lado, se deberá incluir los antecedentes médicos personales y familiares. Por otro lado, se deberá hacer una exploración física para descartar enfermedades sistémicas y pruebas de laboratorio (hemograma, perfil de coagulación), junto con las exploraciones de neuroimagen. Las técnicas radiológicas de neuroimagen más empleadas para el diagnóstico de la HIC son: la tomografía computarizada craneal (TC), la resonancia magnética (RM), la ecografía transcraneal y la angiografía. La TC permite conocer la localización de la lesión, el cálculo del volumen del hematoma y aporta información sobre el efecto de masa que ejerce el hematoma en el resto de la estructura cerebral. Por otro lado, la RM permite detectar de una manera más fiable la HIC aguda, así como HIC pequeñas, microsangrados y otros hematomas crónicos (lesión residual). La Angiografía por Tomografía computarizada craneal (Angio-TC) permite ver el estado de la vascularización cerebral, aportando una imagen sobre la patología vascular estructural cerebral (Becker et al., 1999).

Hoy en día, los marcadores radiológicos son la única herramienta que nos permite identificar la etiología de la HIC. Es de vital importancia poder diagnosticar la etiología de la HIC para poder tratarla correctamente y prevenir recurrencias y otras complicaciones. En los casos de HIC secundaria, es muy importante el historial clínico (coagulopatías, tratamientos anticoagulantes o trombolíticos, eventos isquémicos) y la neuroimagen para descartar vasculopatías o malformaciones, así como tumores. En los casos de la HIC primaria, podemos distinguir su origen por la localización del sangrado por TC y RM, debido a que su patrón varía según la enfermedad que predispone el evento hemorrágico e historia clínica del paciente. Como se explicará más adelante, mientras que el sangrado en la HIC asociada a la hipertensión arterial ocurre en regiones profundas de arterias perforantes (sobre todo putamen y tálamo) en pacientes hipertensos (Mohr et al., 1978), los hematomas en los casos AAC se localizan a nivel lobar (Yamada, 2000) (Figura 1).

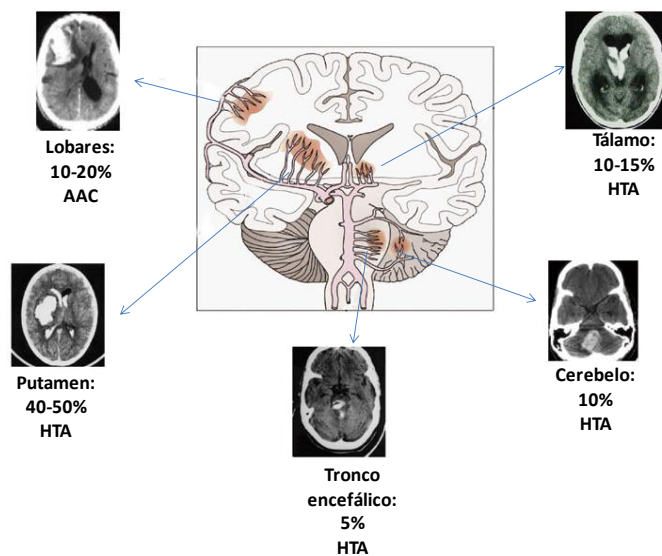


Figura 1. Principales áreas, prevalencia de sangrado y etiología en la HIC primaria espontánea. AAC: angiopatía amiloide cerebral; HTA: hipertensión arterial (Adaptado de Godoy et al., 2015)

1.2.3. Pronóstico de la HIC

En referencia al estado neurológico del paciente, las escalas de valoración neurológica nos permiten cuantificar de forma

bastante fiable la gravedad del ictus, su progresión y desenlace. Se deben aplicar de forma sistemática al ingreso y en intervalos establecidos. La Escala del Ictus del Instituto Nacional de Salud (NIHSS, *National institute of Health Stroke Scale*) es la escala más empleada para la valoración de funciones neurológicas básicas en la fase aguda del ictus isquémico y hemorrágico, tanto al inicio como durante su evolución (Brot et al., 1989). Nos permite detectar fácilmente mejoría o empeoramiento neurológico (aumento de al menos 4 puntos respecto al estado basal) (Montaner, 2006). Por otro lado, una escala muy utilizada para evaluar la discapacidad es la escala funcional del Rankin modificada (mRS), que valora el grado de dependencia a largo plazo (Swieten, et al 1988).

La tasa de mortalidad después de un sangrado cerebral es más del 50% en los 30 primeros días, sobre todo durante la fase aguda (Godoy et al., 2015). El mal pronóstico y ratio de

mortalidad al año depende de la localización y origen del sangrado, siendo del 51% en las HIC en tálamo y putamen, el 41% lobares, 42% en cerebelo y 67% en el tronco encefálico (Godoy et al., 2015). Además, un porcentaje alto de pacientes que sobreviven muestran una discapacidad funcional a largo plazo. De hecho, la recuperación de la independencia funcional sólo abarca el 20% de los pacientes que han sufrido una HIC (Counsell et al., 1995).

Varios factores, radiológicos y variables hemodinámicas se han relacionado con mal pronóstico después de HIC. Entre los factores radiológicos, el crecimiento del hematoma ha demostrado ser un determinante independiente de muerte y discapacidad (Davis et al., 2006; Godoy et al., 2015). En cuanto a los parámetros de hemodinámica, la presión arterial (PA) alta se ha sugerido como factor pronóstico de empeoramiento y podría contribuir a la expansión del hematoma (Morgenstern et al., 2010; Rodríguez-Luna et al., 2013), y su manejo como terapia para mejorar el pronóstico se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios clínicos como el INTERACT, ATACH y ADAPT (Anderson et al., 2008; Qureshi et al., 2007; Butcher et al., 2013). Se ha observado que el control de la temperatura podría estar asociado a una mejoría ya que la hipertermia contribuye a los daños secundarios del hematoma, induciendo varios efectos deletéreos (incrementa el estado inflamatorio, daño a nivel de la barrera hematoencefálica (BHE) y aumenta la presión intracraneal) (Godoy et al., 2015). La edad avanzada ha sido un factor predictivo de mortalidad y discapacidad, no existiendo resultados concluyentes sobre la influencia del sexo en el pronóstico (Díaz-Guzmán et al., 2012). La leucocitosis al ingreso y el nivel de fibrinógeno se han relacionado con un aumento de la mortalidad y peor pronóstico funcional (Bodereick et al., 2007; Rincon y Mayer, 2008). Por último, la hiperglucemia se asociaría también a un mal pronóstico (alta prevalencia de mortalidad al mes), tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos (Fogelholm et al., 2005; Godoy et al., 2015).

1.2.4. Tratamiento de la HIC

Hoy en día no existe un tratamiento efectivo y adecuado para la HIC. A pesar de los estudios llevados a cabo para entender la fisiopatología de esta enfermedad y encontrar tratamientos efectivos, las opciones actuales son limitadas. Las terapias médicas para la HIC se limitan a manejar y reducir la PA, el seguimiento de la presión intracraneal, la osmotherapia, el control de la fiebre y de la glucemia, y la profilaxis de convulsiones (Mayer y Rincon, 2005). La atención y práctica clínica en las unidades de ictus por parte de los neurólogos es el factor determinante sobre la morbilidad y mortalidad en la HIC hasta la fecha.

Los niveles de PA elevada durante la fase aguda de la HIC es un fenómeno común. En este sentido, existen diversos argumentos clínicos para reducir los niveles de PA tras la HIC que se

basan en que la hipertensión se asocia con resultados funcionales poco favorables (Zhang et al., 2008) y puede causar la expansión del hematoma (Rodríguez-Luna et al., 2013). Por ello, diferentes estudios han analizado la importancia de un buen control de la PA y el pronóstico de los pacientes. En los estudios INTEACT e INTERACT-II los pacientes aleatorizados con control de la PA sistólica de 140 mmHg vs 180 mmHg (la PA recomendada por la guía clínicas tradicionales) mostraron una tendencia a la reducción del crecimiento del hematoma sin efectos adversos (Anderson et al., 2008) y una pequeña reducción en el mal pronóstico a los 90 días (Anderson et al., 2013). El ensayo clínico ATACH I y II (actualmente se está llevando a cabo en fase III) sugieren que la reducción de la PA mediante la nicardipina entre las 3-4.5h del inicio de los síntomas reduce la expansión del hematoma, así como las tasas de mortalidad y discapacidad (Qureshi et al., 2007; Qureshi et al., 2012). Por el contrario, ADAPT no mostró cambios clínicos debidos al control de la PA (Butcher et al., 2013).

Por otro lado, algunos ensayos clínicos han demostrado ciertos beneficios a largo plazo del Factor VII activado recombinante (rFVIIa), que podría evitar la expansión del hematoma en pacientes jóvenes que no presenten sangrado abundante si se administra dentro de las 2.5 horas desde el inicio de los síntomas, pero no hay evidencias claras de que la intervención reduzca la tasa de mortalidad (Morgenstern et al., 2010).

1.2.5. Inflamación y respuesta celular tras la HIC

La HIC puede causar un daño cerebral primario y secundario. Mientras que el efecto inmediato de la HIC, como la expansión del hematoma, el incremento de la presión intracraneal y la necrosis del tejido dan lugar a daños primarios (Zhou et al., 2014), efectos subsecuentes como la inflamación, la disrupción de la BHE (responsable de mantener la homeostasis del parénquima cerebral, como se describirá más adelante) y la formación de edema vasogénico, contribuyen a los daños secundarios en el tejido circundante (Chen et al., 2015).

La HIC permite que de manera directa ocurra una infiltración de componentes de la sangre en el sitio de la rotura del vaso cerebral. La respuesta inflamatoria que sigue a esta infiltración da lugar a la liberación de mediadores inflamatorios, activación de proteasas, activación de la microglia y astrocitos, la rotura del tejido cerebral y la activación de procesos de reparación/remodelación de la BHE (Wang y Doré, 2007; Wang y Tsirka, 2005). Varios estudios llevados a cabo mediante la tecnología de microarrays han observado un incremento en la regulación de genes tanto pro- y anti-inflamatorios (como citoquinas y quimioquinas, metaloproteinasas de matriz (MMP), moléculas de adhesión de células del sistema inmune) en

la zona del perihematoma, tanto en tejido cerebral humano (Carmichael et al., 2008; Rosell et al., 2011), como en modelos animales (Lu et al., 2006).

En este sentido la microglia juega un papel importante como regulador de la respuesta inflamatoria. Tras la HIC, la microglia es rápidamente activada en minutos promoviendo su actividad fagocítica para eliminar el hematoma y preservar la supervivencia de las células de la unidad neurovascular. Pero si este proceso perdura en el tiempo, durante la fase subaguda se inicia la cascada inflamatoria y la microglia libera moléculas proinflamatorias como IL-1 β y IL-6, MMP9 o TNF- α vía nuclear factor- κ -B (NF- κ -B) (Chen et al., 2015). Durante esta segunda respuesta, la permeabilidad de la BHE aumenta, provocando un aumento de la extravasación de proteínas plasmáticas al cerebro, neutrófilos y una retención neta de agua en el parénquima (Wang y Doré, 2007; Joice et al., 2009).

Las principales células inflamatorias que se activan y penetran en el cerebro, tanto en el ictus isquémico como en la HIC, son derivados leucocitarios de la sangre. Estudios clínicos y preclínicos han confirmado la toxicidad de los leucocitos en la HIC. Estos estudios observaron la presencia de leucocitos infiltrados en la zona del hematoma y perihematoma en el tejido cerebral en la fase aguda de la HIC (MacKenzie y Clayton, 1999; Wang y Doré, 2007; Zhao et al., 2006). En particular, los neutrófilos tienen un papel importante en los primeros estadios de la fase aguda de la inflamación. El estado inflamatorio provoca la activación cerebral de las células endoteliales, que conduce a un incremento de la adhesión y la trans migración de neutrófilos a través de la barrera endotelial al tejido cerebral, lo que provoca un incremento en la permeabilidad de la BHE. Además, los neutrófilos pueden infiltrarse directamente en el cerebro después de una hemorragia en fase aguda, sin haberse sometido antes a la trans migración (Joice et al., 2009). Algunas evidencias sugieren que la acumulación de neutrófilos mediarían la formación del edema (Wang y Doré, 2007). El edema es clínicamente perjudicial y se relaciona con un mal pronóstico, ya que contribuye a la mortalidad y al daño inicial causado por la HIC. El edema cerebral, causado por la desestabilización de la BHE, es difícil de tratar y su patogenia está poco descrita (Qureshi, et al., 2003).

Como mediadores inflamatorios cabe destacar la familia de las MMPs, ya que algunas de ellas se han propuesto como biomarcadores de HIC. Las MMPs son un conjunto de endopeptidasas zinc-dependientes que están involucradas en la remodelación extracelular y respuesta neuroinflamatoria. Bajo condiciones patológicas, su expresión se ve incrementada y son activadas por diferentes proteasas como plasmina, activador del plasminógeno tisular (tPA) u otras MMPs (Wang y Doré, 2007; Xue et al., 2009). Entre las MMPs, cabe destacar la asociación

de la MMP-9 con la degradación de la lámina basal, disrupción de la BHE y daños secundarios asociados a la HIC. Algunos estudios clínicos han demostrado el incremento plasmático de MMP-9 en la fase aguda y subaguda de la HIC (Abilleira et al., 2003; Alvarez-Sabin et al., 2004; Castellazzi et al., 2010; Silva et al., 2005), y ese incremento se ha relacionado con el crecimiento del hematoma (Silva et al., 2005), formación de edema y empeoramiento de la función neurológica de estos pacientes (Abilleira et al., 2003).

Por ello identificar y entender los mecanismos subyacentes a la hemorragia inicial y la disfunción de BHE durante el daño secundario asociado a la HIC es vital para el desarrollo de técnicas para la prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento (Keep et al., 2014).

1.2.6. La HIC primaria

1.2.6.1. Definición y etiología

La HIC espontánea primaria representa un 15-30% de todos los ictus y afecta a más de 2 millones de personas en todo el mundo (Qureshi et al., 2009; Ribo y Grotta, 2006). Es la HIC más común y representa al menos el 80-85% de todos los casos de HIC. Según la localización del sangrado y el origen que causa la rotura del vaso, existen dos etiologías de la HIC primaria, asociada a la hipertensión o de origen amiloide:

1.2.6.1.1. Hipertensiva (HIC-HTA)

La HTA es la causa más frecuente de HIC, y se estima que es la etiología causante en el 70-90% de los casos de ictus hemorrágico. Se considera que un paciente es hipertenso cuando tiene una historia de uso de fármacos antihipertensivos o una PA alta (sistólica ≥ 140 o diastólica ≥ 90 mm Hg). La mayoría de las HIC-HTA se producen en los ganglios basales, el tálamo, cerebelo y la sustancia blanca subcortical - estructuras irrigadas profundas, principalmente arterias perforantes (Mohr et al., 1978). Aunque en menor incidencia, la angiopatía hipertensiva puede ser también la causa de HIC de localización lobar, (Broderick et al., 1993), afectación más característica de la AAC como se verá más adelante. La hipertensión crónica induce un estrés mecánico constante en las arteriolas cerebrales, que lleva a la hiperplasia de las células del músculo liso induciendo su degeneración, siendo más susceptibles las zonas de bifurcación (Godoy et al., 2015). La patogenia HTA implica la degeneración de la pared de pequeñas arterias y arteriolas, con necrosis fibrinoide, formación de microaneurismas y lipohialinosis (oclusión de arterias profundas), provocando así una disfunción vascular y la rotura del vaso (Fisher, 1973; Araki et al., 1978).

1.2.6.1.2. Angiopatía amiloide cerebral (HIC-AAC)

La AAC es una enfermedad que se define como la deposición de proteína amiloide, en la mayoría de casos péptido beta-amiloide (A β), en la pared de vasos corticales cerebrales y leptomenigeos, arteriolas, capilares, y raramente en venas (Vinters, 1987). La forma más grave de AAC se asocia con cambios vasculopatogénicos, rotura de los vasos y hemorragia cerebral (Vinters, 1987). Aunque en el capítulo 3 de la presente tesis se hablará más extensamente sobre la síntesis y metabolismo de la proteína más comúnmente acumulada (péptidos A β procedentes del procesamiento de la proteína APP (*amyloid precursor protein*), cabe decir que existen otras formas de AAC que se producen por el depósito de proteínas como ABri (*amyloid-British protein*), PrP (*Prion Protein*), cistatina C, gelsolina o transtiretina, y que pueden ser formas familiares de esta enfermedad dando lugar a eventos hemorrágicos en edad temprana (Yamada, 2000). De hecho, a pesar de que la AAC puede ser hereditaria como un trastorno autosómico dominante, la forma más común es la forma esporádica asociada a la edad (Woo et al, 2005; Yamada, 2004). En la Figura 4 (capítulo 3), se muestran las mutaciones en el segmento A β de la secuencia del gen APP que se ha descrito que también pueden dar lugar a formas de AAC hereditarias.

Entre el 10-20% de las HIC primarias en ancianos son debidas a AAC. La localización del sangrado se presenta, en la mayoría de los casos, en el córtex, unión cortico-subcortical o sustancia blanca subcortical (lobar). Las hemorragias pueden ser grandes y sintomáticas o pueden ser pequeñas, en forma de microsangrados asintomáticos (Greenberg et al., 1998). Los pacientes de HIC-AAC presentan daños importantes en la sustancia blanca asociada con una mayor incidencia de deterioro cognitivo, eventos isquémicos, siderosis superficial cortical, múltiples microhemorragias (Figura 2) y una mayor recurrencia hemorrágica con tasas de hasta un 23% por año (Yamada, 2000; Greenberg et al, 2004; Hanger et al., 2007).

Por desgracia, el diagnóstico definitivo de AAC sólo puede ser realizado por la necropsia del cerebro o biopsia cortical, a pesar de que las manifestaciones clínicas permiten la estimación de un diagnóstico como AAC probable o posible de acuerdo con los criterios de Boston (Knudsen et al., 2003). En personas mayores de 55 años, el diagnóstico de probable HIC de causa AAC se define como la presencia de múltiples y exclusivas hemorragias lobares, corticales o cortico-subcorticales; mientras que, el diagnóstico de posible AAC se establece como una única hemorragia lobar, sin otra causa que explique la HIC. Por último, los microsangrados, la siderosis superficial y los espacios perivasculares dilatados observados en RM son otros marcadores importantes en el diagnóstico de la AAC que podrían redefinir los criterios de Boston en un futuro próximo (Linn et al., 2010; Charidimiou et al., 2014).

A parte de las técnicas radiológicas, los depósitos de A β vascular se pueden detectar actualmente por tomografía de emisión de positrones (PET) con el radioligando [^{11}C]-*Pittsburgh Compound B* (PiB) (Ly et al., 2010). Por desgracia, es un método que requiere instalaciones altamente especializadas y un coste muy elevado en la producción del radioligando. Debido a que los neurólogos principalmente disponen de las técnicas de neuroimagen, es de vital importancia encontrar biomarcadores que agilicen y complementen el diagnóstico de manera no invasiva.

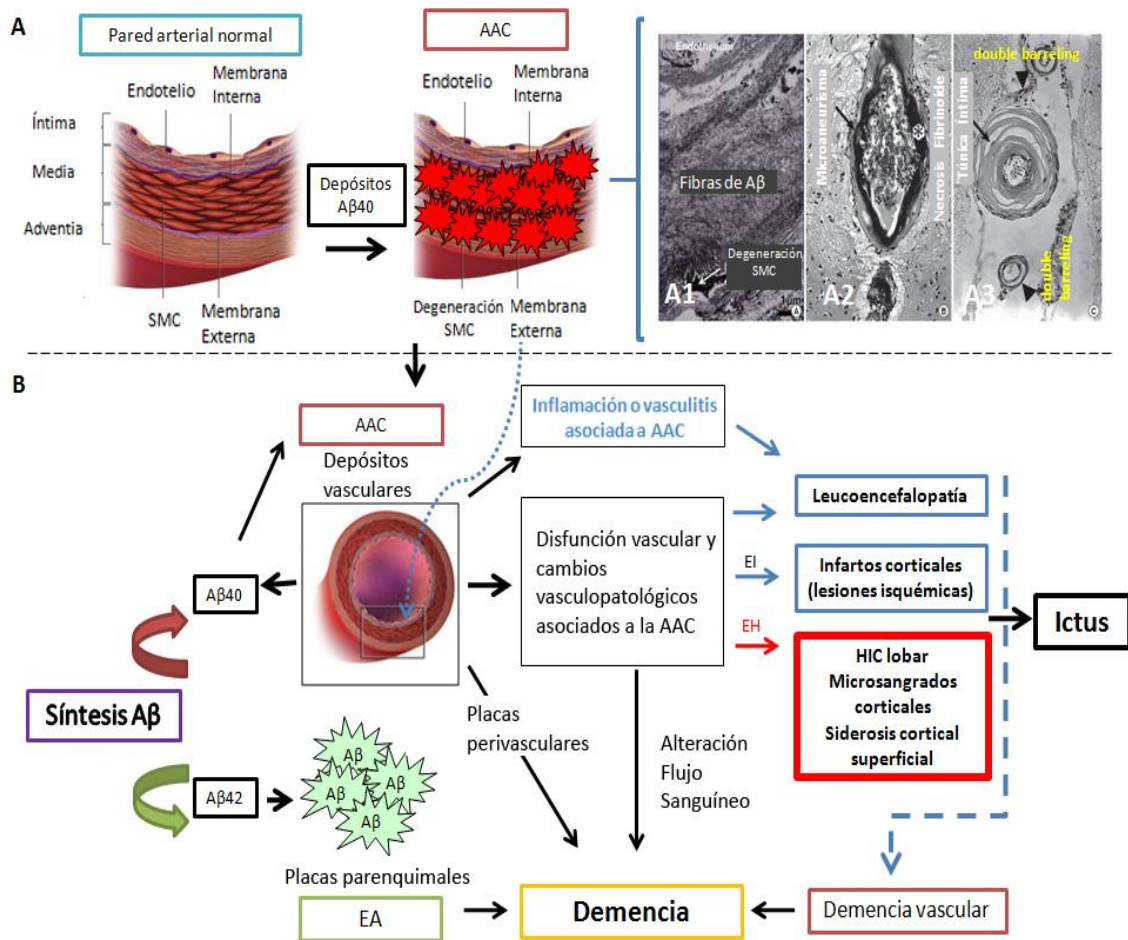


Figura 2. Patofisiología de los trastornos inducidos por la AAC en la unidad neurovascular. A) Representación de la estructura de una arteria en condiciones fisiológicas o tras la acumulación amiloide; **A1)** Imagen de la degeneración de las células del músculo liso cerebrovascular por los depósitos de fibras amiloides. **A2)** Microaneurisma (flecha) y necrosis fibrinoide (*). **A3)** Engrosamiento de la túnica íntima (flecha) y aspecto de doble vaso (“double barreling”) de la pared vascular (punta de flecha negra). **B)** Esquema representativo de los efectos cognitivos y patológicos del depósito de A β en cerebro. SMC=células del músculo liso; EI= evento isquémico; EH= evento hemorrágico (Adaptado de Yamada, 2015).

1.2.6.2. Biomarcadores de la HIC primaria

En el año 2001, se publicó la definición oficial de marcador biológico o biomarcador, como aquella sustancia característica que puede ser medida de forma objetiva y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Biomarkers Definition Working group, 2001).

Existen moléculas plasmáticas que participan en vías como la coagulación, inflamación y apoptosis que se ha demostrado que cambian sus niveles durante la HIC en fase aguda en comparación a controles. Algunas de estas moléculas son la MMP-9 (Abilleira et al., 2003), osteopontina (Acar et al., 2012), la copeptina (Zhang et al., 2012), la leptina (Dong et al., 2010), la proteína Gla de matriz (Acar et al., 2012), el s-Fas (Delgado et al., 2008), la fetuina-A (Acar et al., 2012) o la actividad oxidasa de la proteína de adhesión vascular 1 (VAP1/SSAO; *Vascular Adhesion Protein-1/Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase*) (Hernández-Guillamon, et al. 2012a). Por otro lado, otros estudios han propuesto biomarcadores para diferenciar el tipo de ictus, isquémico o hemorrágico, como son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) (Dvorak et al., 2008; Undén et al., 2009), la proteína glial S100 de unión al calcio (S100B, *S100 calcium binding protein B*) (Montaner et al., 2012) y el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) (Montaner et al., 2012), la proteína de unión al retinol (RBP4, *Retinol binding protein 4*) (Llombart et al., 2015) o los niveles de proteína C reactiva (hs-CRP, *high-sensitivity C reactive protein*) (Roudbary et al., 2011).

Aún así, hasta la fecha no existen biomarcadores propios de AAC o HIC hipertensiva que por su patrón de expresión nos permitan diferenciarlas. En este sentido, diferentes grupos han intentado seguir el A β vascular analizando sus niveles en muestras biológicas de pacientes con AAC. De hecho, se han encontrado niveles más bajos de A β (1-40) y A β (1-42) en líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes de AAC que en controles sanos o pacientes con EA. En cambio, se ha detectado que los pacientes con AAC presentan niveles de Tau total y Tau fosforilada en LCR por debajo de los encontrados en EA, pero por encima de sujetos control (Verbeek et al. 2009; Renard et al. 2012). En cuanto a marcadores circulantes en plasma, los resultados encontrados referentes a los niveles de A β (1-40) y A β (1-42), han sido más dispares entre estudios (Greenberg et al., 2000; Hernández-Guillamon et al., 2012b) y no se ha conseguido encontrar diferencias significativas en plasma de pacientes en fase aguda que han sufrido una HIC primaria de origen AAC o HTA (Greenberg et al., 2000).

Por lo tanto, hasta la fecha, no existen buenos biomarcadores que nos permitan diferenciar entre HIC primarias. La necesidad de encontrar biomarcadores específicos para enfermedades difíciles de diagnosticar y pronosticar, como es el caso de la HIC de origen amiloide, son de vital importancia para la prevención y el manejo de la enfermedad, así como para establecer su pronóstico y en el futuro intentar evitar la elevada recurrencia hemorrágica de algunos de los pacientes que la padecen. El aporte de biomarcadores junto con la neuroimagen podría ayudar al diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad, y así encontrar tratamientos preventivos y mejorar la monitorización de futuras terapias. Además, encontrar biomarcadores de AAC incrementaría la seguridad de los anticoagulantes en pacientes de edad avanzada (actualmente tratamiento contraindicado en la AAC). Así pues, el descubrimiento de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de HIC primaria va a ser uno de los principales objetivos de esta tesis.

1.2.7. HIC secundaria

La HIC secundaria representa el 15-20% de los ictus hemorrágicos y se asocia principalmente con sangrados debidos a malformaciones vasculares, uso de anti-coagulantes, traumatismos craneales, tumores cerebrales e ictus isquémico (Keep et al., 2014). Los mecanismos implicados en las diferentes etiologías que se asocian a la HIC secundaria están recogidos en la Tabla 1. De entre las causas más comunes de HIC secundaria, debemos mencionar que el tratamiento trombolítico en el ictus isquémico aumenta considerablemente el riesgo de la aparición de eventos hemorrágicos (conocidos como transformación hemorrágica, TH) (Hacke et al., 2008), siendo considerado uno de los principales efectos adversos en este tratamiento.

Tabla 1. Principales causas de HIC primarias y secundarias (Adaptado de Keep et al., 2014)

Tipo HIC	Etiología	Mecanismo
Primaria	HTA	Remodelación vascular, necrosis fibrinoide y microanuerismas.
Primaria	AAC	Daño vascular por el péptido β beta-amiloide
Secundaria	Malformación vascular	Debilidad de la pared vascular
Secundaria	Uso de anti-coagulantes	Pérdida de la respuesta de coagulación
Secundaria	Traumatismo	Disrupción física vascular
Secundaria	Tumores cerebrales	Vasculatura anormal
Secundaria	Ictus isquémico	Daño vascular por condiciones isquémicas y reperusión. El riesgo de HIC sintomática incrementa con el tratamiento trombolítico r-tPA

Como se describirá en el capítulo 2, en esta tesis nos hemos centrado en los efectos deletéreos causados por el tratamiento con r-tPA en el ictus isquémico y que podrían estar relacionados con la aparición de transformaciones hemorrágicas.

Capítulo 2. Transformación hemorrágica asociado al tratamiento trombolítico en el ictus isquémico

2.1. Ictus isquémico

Como hemos descrito anteriormente, el ictus isquémico o infarto cerebral es un trastorno neurológico producido por la interrupción del flujo sanguíneo de una determinada región cerebral. Esta alteración del flujo puede ser transitoria (si se restablece espontáneamente o mediante acciones terapéuticas) o permanente.

Existen varios criterios para clasificar el ictus isquémico según la etiología, duración de los síntomas, localización de la oclusión arterial y territorio de cerebro afectado. Los criterios "TOAST" (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) (Adams *et al.* 1993) son los más utilizados para clasificar la etiología del ictus en 5 subgrupos: aterotrombótico, cardioembólico, lacunar, de causa inhabitual o etiología indeterminada.

En el ictus isquémico en fase aguda, la interrupción del flujo sanguíneo activa diferentes procesos celulares y moleculares a nivel tisular, que llevan a la rápida necrosis del *core* del infarto. Debido a esto, hay una hiperfusión en el área que rodea al *core*, definida como zona de penumbra o peri-infarto, que aún estando metabólicamente comprometida, mantiene la integridad morfológica pudiendo ser recuperada si la lesión infartada no se extiende (Heiss, 2010). Por ello, el tratamiento agudo del ictus isquémico tiene como objetivo revertir y frenar los efectos deletéreos en la zona del peri-infarto. Por tanto, la rapidez con la que se actúa es crucial para evitar el crecimiento del *core* del infarto.

2.2. Fármacos trombolíticos: r-tPA

Los fármacos trombolíticos o fibrinolíticos permiten la degradación del trombo o émbolo que ocluye el vaso, para poder restaurar el flujo sanguíneo y permitir la entrada de oxígeno y nutrientes al tejido. Actualmente, el único fármaco aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el ictus isquémico en la fase aguda es el activador de plasminógeno tisular recombinante (r-tPA, del inglés *recombinant tissue plasminogen activator*).

El tPA es una serin proteasa que se encuentra de manera fisiológica en sangre y cerebro. A nivel sistémico, la actividad catalítica del tPA (endógeno y exógeno) es rápidamente inactivada por la unión del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor 1*). El complejo tPA/PAI-1 es eliminado en el hígado mediante el receptor

de lipoproteínas de baja densidad LDL, LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related 1*) (Yepes et al., 2003). La rápida eliminación vía LRP1 hace que el tPA tenga un tiempo de actividad y vida media de 5 a 10 minutos en el torrente sanguíneo humano (Gravanis y Tsirka, 2008). A nivel cerebral, el tPA controla diferentes funciones cerebrales a través de su actividad proteolítica (Parcq et al., 2012) y se han identificado varios tipos celulares que expresan tPA, como células endoteliales de pequeños vasos (Levin y del Zoppo, 1994), neuronas y microglia (Siao et al., 2003). En cerebro, la neuroserpina (inhibidor de serinoproteasas) regula la actividad del tPA uniéndose a él (Miranda y Lomas, 2006). A nivel de BHE, el tPA se une al receptor LRP1 de las células endoteliales y se cree que tiene un papel en la regulación de la permeabilidad de la BHE (Yepes et al., 2003).

La administración intravenosa de r-tPA en la fase aguda del ictus isquémico produce trombolisis local mediante la conversión de plasminógeno a plasmina, que a su vez degrada la fibrina, deshaciendo el coágulo y permitiendo así la recanalización del vaso ocluido (Gravanis y Tsirka, 2008). Además de su valor terapéutico, también existen posibles efectos secundarios del r-tPA, que pueden agravar la lesión cerebral y descompensar los beneficios proporcionados por la reperfusión de la arteria ocluida (Adibhatla y Hatcher, 2008) (Figura 3).

El r-tPA debe ser administrado antes de las 4.5 h del inicio de los síntomas (Hacke et al., 2008). Se administra vía intravenosa a dosis de 0.9mg/kg; 10% en forma de bolo durante un minuto y el resto, hasta un máximo de 90mg mediante la perfusión continua durante una hora. En el 55% de los casos tratados se consigue la recanalización arterial, aunque muchos de ellos presentan reoclusión tras el tratamiento (Kharitonova, et al., 2009). Además, a pesar de su gran eficacia disolviendo el coágulo, tan sólo un 5 % de estos pacientes pueden beneficiarse de él debido a su estrecha ventana terapéutica por el riesgo de padecer una HIC o TH (Hacke et al., 2008), como se explicará en el siguiente apartado.

Además de la administración intravenosa, recientemente se han puesto en práctica el tratamiento endovascular (administración intraarterial), la extracción mecánica del trombo o aplicación de ultrasonidos en la arteria ocluida junto con la administración intravenosa (Tsvigoulis et al., 2010; Pereira et al., 2012). Estas técnicas son altamente prometedoras ya que aumentan las tasas de recanalización hasta el 80% sin incrementar la aparición de eventos hemorrágicos y son muy útiles en pacientes que no responden al tratamiento intravenoso (Boderick et al., 2013; Khan et al., 2013). De hecho, a partir de la publicación de los resultados de los principales ensayos clínicos de trombectomía mecánica (Berkhemer et

al., 2014; Saven et al., 2015; Jovin et al., 2015; Goyal et al., 2015; Campbell et al., 2015), se han modificado las guías de práctica clínica del ictus y su uso se ha empezado a extender debido al enorme beneficio clínico que suponen estas técnicas, especialmente en aquellos ictus con oclusión de gran vaso.

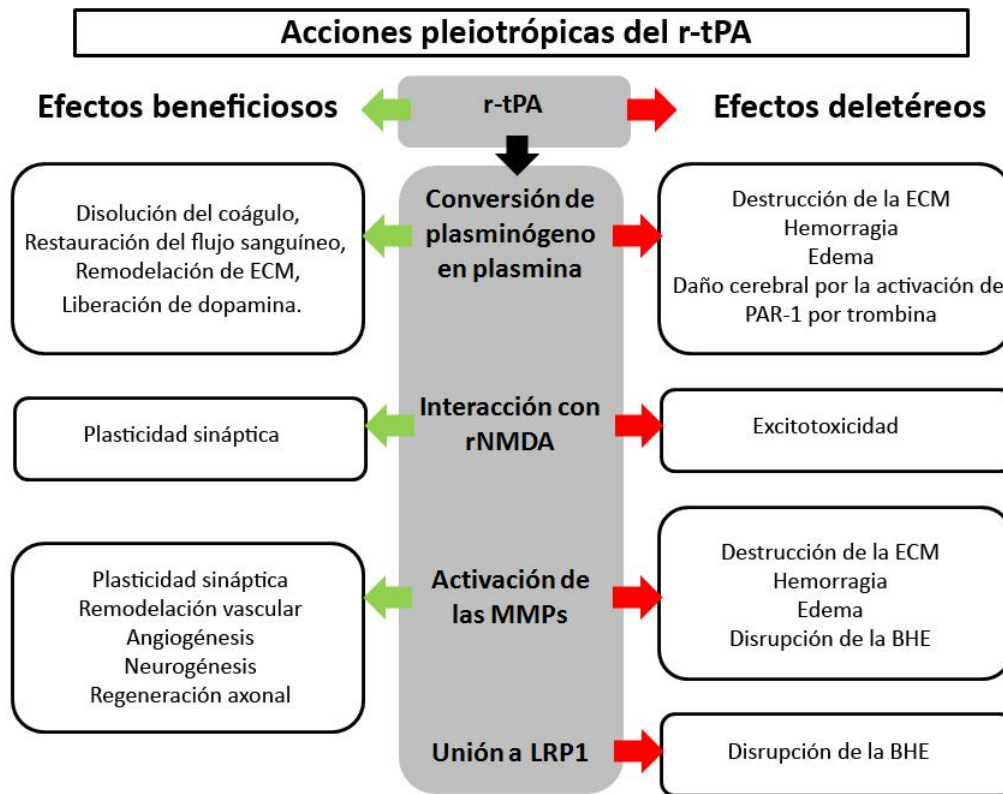


Figura 3. Acciones pleiotrópicas de la administración de r-tPA en la fase aguda del ictus isquémico. ECM=matrix extracelular. PAR-1: receptor activado por proteasas 1 (Adaptado de Adibhatla y Hatcher, 2008)

2.3. Transformación hemorrágica asociada a tratamiento trombolítico

Las TH afectan entre un 10 a un 30% de los pacientes con ictus isquémico (Terruso *et al.* 2009; Hacke et al., 2008), y se asocian a un incremento en la morbilidad y mortalidad (Fiorelli *et al.* 1999). La TH sintomática es una de las complicaciones más comunes tras el tratamiento trombolítico incrementándose su aparición hasta 10 veces en comparación a pacientes con ictus isquémicos no tratados (2,4-6% vs 0,2-0,6%) (Hacke et al., 1995; Hacke et al., 2008).

Los factores que predisponen a la TH no están del todo definidos, pero diferentes variables clínicas se han asociado con el riesgo e incremento de TH tras la terapia trombolítica. Entre

ellas, destacan el tiempo desde el inicio de los síntomas, la leucoaraiosis, el valor basal de NIHSS, la diabetes, la PA sistólica alta, la edad, la hipertensión y la trombocitopenia, entre otras (Derex y Nighoghossian, 2008; Lansberg et al., 2007; Jickling et al., 2014).

Las complicaciones hemorrágicas se diagnostican mediante el uso de técnicas radiológicas como la TC o RM. Para evaluar el pronóstico de los pacientes que sufren una TH, los neurólogos han clasificado las complicaciones hemorrágicas según la gravedad e imagen radiológica en 6 tipos (Tabla 2) (Pessin et al., 1990). La TH sintomática es la complicación más temida cuando se inicia un tratamiento trombolítico y se define como una TH que conlleva empeoramiento neurológico en las primeras 48 horas tras el inicio de los síntomas. Principalmente se asocia a las TH de tipo PH2 (Fiorelli et al. 1999), y se estima que ocurre en el 2-8% de los casos (Hacke et al., 1998; Hacke et al., 2008).

Tabla 2. Clasificación radiológica de las transformaciones hemorrágicas (Martí-Fàbregas et al., 2007).

Tipo de TH	Criterios Radiológicos
HI1 (infarto hemorrágico tipo 1)	Pequeñas petequias en la periferia del infarto.
HI2 (infarto hemorrágico tipo 2)	Petequias confluentes en el área del infarto sin efecto masa.
PH1 (hemorragia parenquimatosa tipo 1)	Sangre en < 30% del área de infarto; puede tener ligero efecto de masa
PH2 (hemorragia parenquimatosa tipo 2)	Sangre en > 30% del área de infarto, efecto de masa evidente
RPH1 (hemorragia parenquimatosa remota tipo 1)	Hemorragia de volumen pequeño-mediano sin relación con el infarto; puede tener ligero efecto de masa.
RPH2 (hemorragia parenquimatosa remota tipo 2)	Hemorragia extensa confluyente sin relación con el infarto; efecto de masa evidente.

2.4 Mecanismos moleculares implicados en la toxicidad del r-tPA

A parte de los desajustes en la cascada de coagulación, el r-tPA activa diferentes vías moleculares a nivel tisular que dan lugar a efectos deletéreos no relacionados con su actividad fibrinolítica (Figura 3). Como hemos explicado, este tratamiento tiene una estrecha ventana terapéutica debida a las complicaciones asociadas a éste, siendo una de las más importantes la TH y el daño neuronal. Como se describirá a continuación, durante los últimos años se ha puesto de manifiesto que la aparición de la TH tras el tratamiento trombolítico podría estar causada, en parte, por los efectos no fibrinolíticos que llevan a la activación y reclutamiento de leucocitos y la disrupción de la BHE (Figura 4) (Jickling et al., 2014).

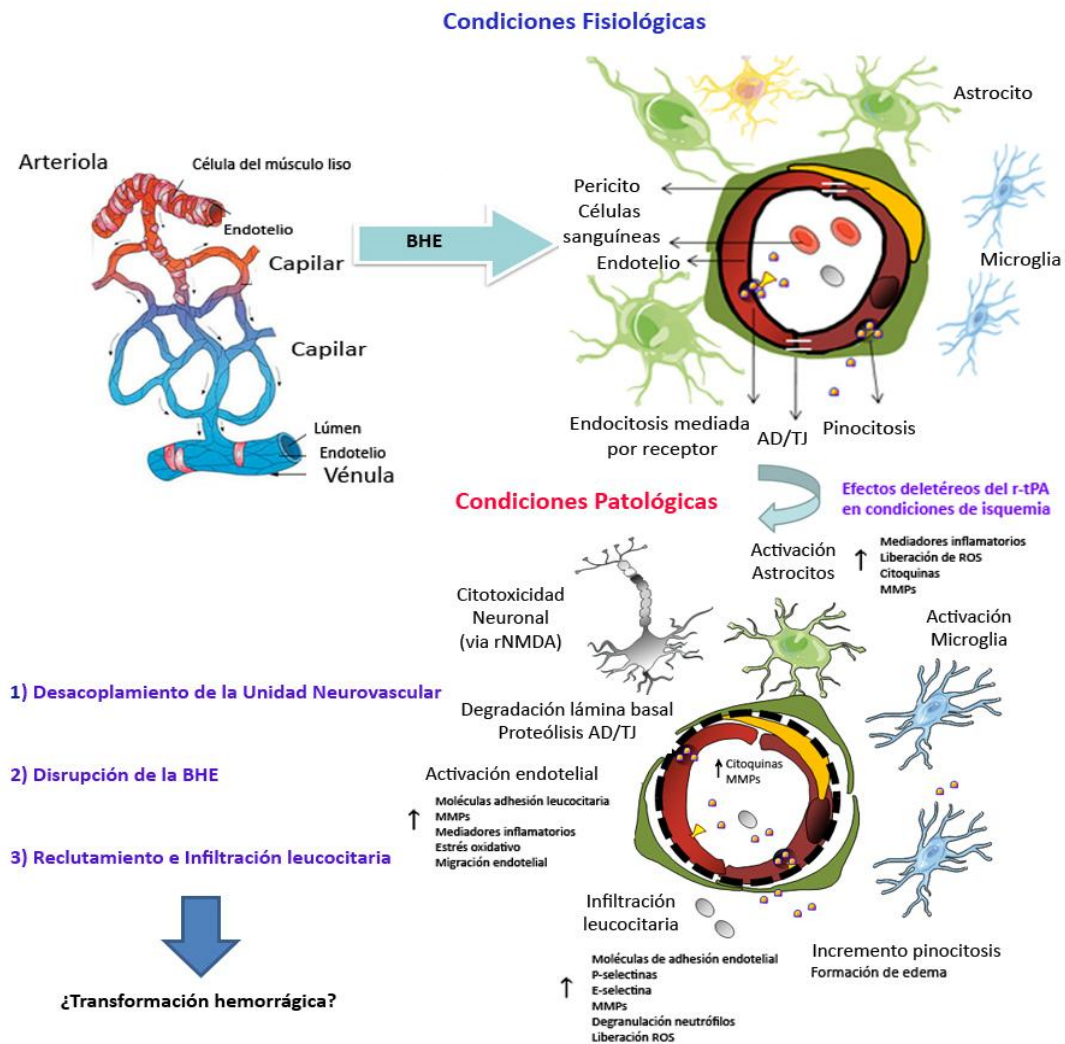


Figura 4 Reorganización de la NVU en respuesta a condiciones neuropatológicas. El cuadro superior muestra la BBE bien estructurada, mientras que en el cuadro inferior se muestran algunos de los procesos fisiopatológicos asociados a la disrupción de la BBE tras la administración de r-tPA en condiciones isquémicas. Entre ellos, la lesión neuronal, activación de astrocitos, de microglia, y la estimulación de la proliferación endotelial y la migración con la consiguiente interrupción de la expresión de las TJ y una mayor permeabilidad de la BBE, con la extravasación de proteínas plasmáticas y formación de edema. La liberación de metaloproteasas mediante la migración de las células endoteliales y pericitos conduce a la degradación de la de la membrana basal. La secreción de mediadores inflamatorios por parte de astrocitos activados y células endoteliales estimula la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y el reclutamiento de células inflamatorias en el cerebro e infiltración de neutrófilos. Especies reactivas del oxígeno y proteasas liberadas por los leucocitos y células perivasculares activados causan estrés oxidativo que contribuye a la disrupción de la BBE.

Se han descrito dos tipos de TH según el tiempo de aparición: temprana (si se producen en las primeras 18-24 horas) y tardía (tras las 24 primeras horas). Los mecanismos implicados en la disrupción de la BBE y la consecuente aparición de TH son diferentes en cada caso. Los mecanismos implicados en la TH temprana son principalmente el daño en los capilares

por las especies reactivas del oxígeno (eROS), la activación e infiltración de leucocitos al cerebro y la liberación de MMPs secretadas por los neutrófilos. En cambio, los implicados en la TH tardía se relacionarían con las MMPs liberadas por diferentes tipos celulares de la unidad neurovascular, la neuroinflamación (microglia activada y infiltración de monocitos que se convertirán en macrófagos) y mecanismos que se activan durante la remodelación vascular (Jickling et al., 2014) (Figura 4).

2.4.1. Disrupción de la BHE por r-tPA

Como se mostrará a continuación, se han estudiado diferentes vías activadas por tPA (endógeno y exógeno) en condiciones isquémicas y que contribuyen al daño neuronal (excitotoxicidad) y a la disrupción de la BHE, la cual se caracteriza por ser una barrera físico-química y enzimática que permite el transporte selectivo de sustancias (Figura 4). Además de la BHE, la lámina basal también previene de la extravasación de compuestos celulares de los capilares y arteriolas al parénquima. Tanto la isquemia cerebral como el r-tPA promueve la expresión y liberación de MMPs por parte de leucocitos activados por la inflamación, así como también por los diferentes tipos celulares de la unidad neurovascular tras el estado de neuroinflamación (Jickling et al., 2014). De hecho, hay evidencias claras entre una elevada concentración de MMP-9 plasmática y una subsecuente TH inducida por el r-tPA en pacientes que han sufrido un ictus isquémico (Castellanos et al., 2003; Castellanos et al., 2007; Montaner et al., 2001, 2003; Ning et al., 2006). En un modelo animal de isquemia cerebral basado en la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) también se ha observado un incremento en la actividad y expresión de MMP9 tanto en plasma como en tejido cerebral dando lugar a la disrupción de la BHE y la degradación de la lámina basal (Tsuji et al., 2005; Yepes et al., 2003) (Figura 4).

Muchos de los efectos tóxicos atribuidos al r-tPA se justifican por su entrada al cerebro a través del receptor LRP1. Un incremento en la transcitosis mediada por la vía tPA-LRP1 a nivel endotelial se ha relacionado con un incremento en la permeabilidad y disrupción de la BHE tanto en condiciones isquémicas como fisiológicas (Yepes et al., 2003; Popavarapu et al., 2007; Benchenane et al., 2005). Algunos autores han propuesto que si durante la acción del r-tPA los efectos de la isquemia se revierten rápido, el r-tPA permanece en el espacio vascular y la BHE permanece intacta. Pero si las condiciones isquémicas se prolongan, y la acción trombolítica es ineficiente, hay un riesgo de que el r-tPA atraviese la BHE vía LRP1 y entre al parénquima encefálico, incrementando la permeabilidad vascular y dañando la unidad neurovascular (Adibhatla y Hatcher, 2008; Yepes et al., 2009), dando lugar a complicaciones hemorrágicas (Jickling et al., 2014). Además, la interacción tPA-LRP1 da lugar

a la activación de la vía NF- κ B, lo que genera un incremento de la expresión y activación de MMPs (Suzuki et al., 2009) y del estrés oxidativo (Zhang et al., 2007).

2.4.2. Excitotoxicidad

Por otro lado, el r-tPA es capaz de activar el receptor N-Metil-D-Aspartato (rNMDA), receptor de glutamato que es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro. Se ha observado que a nivel neuronal el tPA puede interactuar con la subunidad NR1 del receptor NMDA y con su actividad proteolítica incrementa la excitotoxicidad de esta vía (Nicole et al., 2001). Tanto *in vivo* como *in vitro*, el tPA incrementa la entrada de calcio en neuronas vía rNMDA, contribuyendo a la neurotoxicidad en neuronas corticales y excitotoxicidad en neuronas del hipocampo (Parcq et al., 2012). Los efectos adversos del tPA dependen de la forma del tPA (su conformación en una o dos cadenas), la dosis el tipo de receptor que active con su actividad proteolítica, y el tipo neuronal donde actúe (Parcq et al., 2012; Chevilly et al., 2015).

2.4.3. Inflamación periférica y neuroinflamación: infiltración de leucocitos

Al igual que se ha explicado en el capítulo 1 tras la hemorragia cerebral, en el ictus isquémico se produce un estado de inflamación. Tanto la isquemia cerebral, tras la administración de r-tPA, como la reperfusión, promueven un estado inflamatorio que se inicia en la microcirculación. Las células endoteliales, los astrocitos y la microglia se activan por la liberación de citoquinas sistémicas (TNF, IL-1, entre otras), que inician una respuesta inflamatoria (Hallenbeck, 1996). Éstas activan la cascada molecular que da lugar a una segunda respuesta inflamatoria más duradera mediada por otras citoquinas como IL-8 o IL-6, quimioquinas y moléculas de adhesión celular en el endotelio vascular y leucocitos. Estos mediadores inflamatorios producen efectos deletéreos sobre las proteínas ocluyentes (TJ, *Tight Junctions*) (Huber et al., 2001a; 2001b) incrementando la permeabilidad de la BHE. De nuevo, las MMPs juegan un papel importante tanto en el incremento de la permeabilidad via proteólisis de la lámina basal y TJ, así como en la infiltración de neutrófilos (Rosell et al., 2008) (Figura 4).

Por otro lado, el r-tPA puede regular genes relacionados con la respuesta inmune en leucocitos. Se ha observado que el r-tPA incrementa la expresión de moléculas de adhesión endotelial como ICAM2, P-selectinas y E-selectinas en células del sistema inmune (Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2008), moléculas de adhesión intercelular (como ICAM2), proteína inhibitoria de unión al DNA (ID2), o actinina (ACTN1) involucrados en la adhesión de células inflamatorias, migración y reclutamiento Jickiling et al., 2010. Por su parte, a nivel

endotelial también se ha descrito un incremento de VAP-1 endotelial en pacientes con TH asociada a r-tPA y de su forma soluble en plasma (Hernandez-Guillamon et al., 2010). Se hipotetiza que el incremento en la expresión de estas moléculas de interacción endotelio-leucocito podría tener un papel relevante en la disrupción de la BHE y podría estar asociado a la aparición de TH debido al r-tPA (Figura 4).

En el caso concreto de los neutrófilos, su activación ocurre en las fases tempranas del ictus isquémico y se ha visto que el r-tPA promueve la activación de la expresión de genes implicados en su migración, reclutamiento y adhesión al endotelio (como por ejemplo el factor estimulante de macrófagos (CSF1, del inglés *Colony stimulating factor 1*), Annexina y selectinas) (Jickling et al., 2010). El r-tPA también promueve la degranulación de neutrófilos (Cuadrado et al., 2008), liberando enzimas proteolíticas, como MMP9, para facilitar la transmigración de leucocitos a través de la BHE al cerebro, pudiendo contribuir a la aparición de TH (Justicia et al., 2003; Gidday et al., 2005; Rosell et al., 2006) (Figura 4).

2.5. Biomarcadores de TH

En los últimos años, muchos autores han realizado estudios en busca de biomarcadores plasmáticos para poder mejorar la eficacia del tratamiento trombolítico y pronosticar posibles complicaciones hemorrágicas. Como ya se ha descrito anteriormente, las MMPs juegan un papel importante en la aparición de TH. Por ejemplo, diferentes estudios han determinado que los valores basales de MMP-9 en plasma de pacientes con ictus isquémico son un buen marcador pronóstico de la aparición de la TH tras el tratamiento trombolítico, y se ha sugerido que la determinación de sus niveles plasmáticos podría ser un biomarcador pronóstico antes de la administración del r-tPA (Castellanos et al., 2003; Montaner et al., 2003; Horstmann et al., 2003; Barr et al., 2010). Otros estudios han encontrado asociaciones entre el riesgo de sufrir una TH y los niveles plasmáticos de moléculas implicadas en la cascada de coagulación/fibrinólisis, como la fibronectina (Castellanos et al., 2004; Castellanos et al., 2007), el fibrinógeno (Trouillas et al., 2004), el inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) (Ribó et al., 2004), o el inhibidor del plasminógeno tisular (PAI-1) (Ribó et al., 2004); y moléculas relacionadas con la inflamación o infiltración leucocitaria, como la proteína de adhesión vascular (VAP-1) (Hernández-Guillamon et al., 2010), S100B (Foerch et al., 2007), la Proteína C activada (APC) (Mendioroz et al., 2009), o el factor de crecimiento derivado plaquetario (PDGF-CC) (Rodríguez-Gonzalez et al., 2013), el cual regula la permeabilidad y integridad de la BHE tras la administración de r-tPA (Su et al., 2008). Aunque algunos de estos resultados son prometedores, ningún biomarcador se ha llevado a la práctica clínica hasta la fecha.

Capítulo 3. Transporte de A β a través de la BHE

3.1. Depósito de β -Amiloide cerebral

Como se ha comentado anteriormente, la acumulación de péptido A β es el causante de la degeneración de los vasos y responsable de las HIC lobares en la mayoría de los casos de AAC. Por otro lado, el depósito de A β en el parénquima cerebral se asocia a la enfermedad de Alzheimer (EA) (Yamada, 2000).

Como se ha descrito extensamente en el Capítulo 1, el término angiopatía cerebral amiloide (AAC) describe un grupo heterogéneo de diversos desordenes bioquímicos y genéticos del sistema nervioso central (Biffi y Greenberg, 2011), el cual se caracteriza por la acumulación de proteína amiloide, en la mayoría de los casos de péptido A β , en la pared de los vasos corticales cerebrales y leptomenígeos, arteriolas, en algunos casos en capilares, y raramente en venas (Vinters, 1987). La acumulación induce la degeneración de las células del músculo liso, produciendo cambios vasculopatogénicos, provocando la rotura del vaso en los casos más graves y la consiguiente aparición de una HIC (Yamada et al., 2015).

Por su parte, la EA es la enfermedad neurodegenerativa y la causa de demencia más común en personas de edad avanzada (Selkoe, 1991). Se caracteriza por la acumulación de A β junto con otras proteínas formando placas seniles extracelulares y la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares formados por la proteína tau hiperfosforilada en el parénquima encefálico, lo que lleva al daño y pérdida neuronal (Selkoe, 1991; LaFerla y Oddo, 2005).

La prevalencia de la AAC en enfermos de EA es muy alta en comparación con casos sin demencia tipo EA (Kumar-Singh, 2008; Thal et al., 2008). En el estudio llevado a cabo por Thal y sus colaboradores (2008), la prevalencia de AAC en pacientes sin demencia era de un 40% aproximadamente, pero en enfermos de Alzheimer, el 91% de los casos presentaban AAC (Thal et al., 2008). A pesar de esto, la mayoría de pacientes diagnosticados con HIC-AAC no tienen síntomas preexistentes de EA (Greenberg et al., 1996; Mandybur, 1986; Vinters, 1987; Smith et al., 2004) y tan sólo una minoría de enfermos de EA presenta hemorragias que se asocian a una AAC en estado avanzado (Ellis et al., 1996).

3.1.1. Péptido β -amiloide (A β)

El péptido β -amiloide (A β) es un péptido derivado del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). Aunque se desconoce exactamente las funciones fisiológicas del

APP, se ha observado que participa en diferentes procesos, como la adhesión entre células y la matriz extracelular (Mattson, 1997) o la o la migración de precursores neuronales durante el desarrollo cerebral (Young-Pearse et al., 2007). En condiciones fisiológicas, la APP es cortada primero por la α -secretasa y posteriormente por el complejo γ -secretasa, formado por Presenilina 1 y 2, nicastrina, APH-1 (*anterior pharynx-defective-a*) y PEN-2 (*presenilina enhancer 2*) (Edbauer et al., 2003). La vía alternativa amiloidogénica consiste en que la APP es cortada por la enzima β -secretasa (BACE-1) (Vassar et al., 1999) y seguidamente por la γ -secretasa (Selkoe, 1998). De este último procesamiento de APP se generan péptidos A β con diferentes longitudes, siendo la formas mayoritarias de 40 y 42 aminoácidos, este último mostrando más toxicidad y mayor capacidad de agregación *in vitro* (Selkoe et al., 2001; Fisher et al., 2013; Gu y Guo, 2013). (Figura 5).

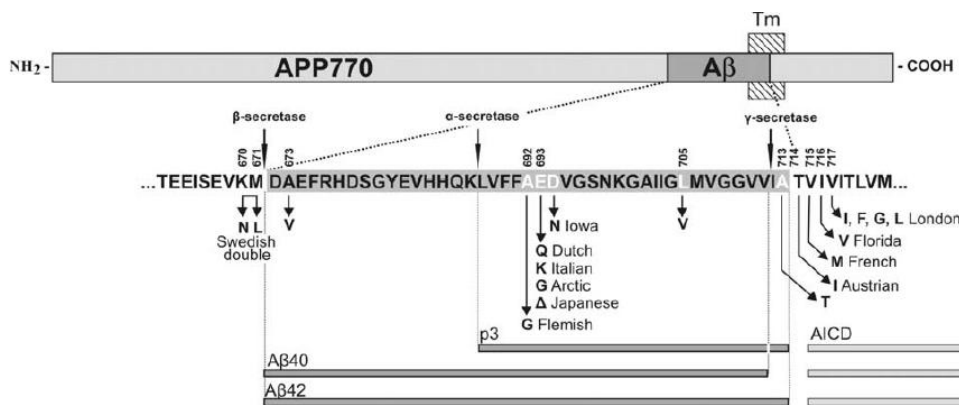


Figura 5 Representación esquemática del procesamiento del gen APP y secuencia del péptido A β ₄₀ y 42. Las flechas indican las posiciones donde actúan las proteasas β -, α - y γ -secretasa, y las principales mutaciones en el segmento génico de A β causantes de las principales formas de AAC hereditarias. Tm=dominio transmembrana. (Adaptación de Kumar-Singh, 2009)

Por razones aún desconocidas, el A β (1-42) es el principal componente de las placas seniles en el parénquima cerebral en EA, y por el contrario, el A β (1-40) lo es en la pared de los vasos en casos de AAC (Attems, 2005). En ambos casos, los monómeros solubles de A β se unen para formar oligómeros y fibras insolubles (Walsh y Selkoe, 2007).

A nivel vascular, diferentes estudios han mostrado que el péptido A β en su forma soluble causa una reactividad vascular anormal. La exposición de A β a vasos normales *ex vivo* causa una vasoconstricción endotelial dependiente del péptido (Thomas et al., 1996; Townsend et al., 2002). *In vivo*, tras el tratamiento con el péptido A β (1-40) en el neocortex de ratón se observó vasoconstricción (Niwa et al., 2000), y en un modelo animal de AAC y EA en fases

tempranas de edad (con ausencia de acumulación amiloide cerebral), se observó una reducción en el flujo sanguíneo (Niwa et al., 2002a; Niwa et al., 2002b). Estos efectos en la disfunción endotelial inducida por A β se han relacionado con la formación de radicales libres de oxígeno (Thomas et al., 1996) por las enzimas NADPH oxidasas (Park et al., 2005). Además, se ha observado que las fibras de A β incrementan la permeabilidad *in vitro* (Nagagbabu et al., 2009) y producen respuestas proinflamatorias, proapoptóticas y proangiogénicas en las células endoteliales (Dickstein et al., 2006), lo que llevaría a la disrupción de la BHE.

3.1.2. Síntesis A β

El origen del A β en la AAC y la EA, y el mecanismo por el cual se deposita en el cerebro, no está del todo claro. La teoría más aceptada se basa en el origen neuronal del A β (Herzig et al., 2006), ya que estudios en animales transgénicos demuestran que la expresión específica de APP mutado a nivel neuronal causa depósitos extracelulares de A β insoluble en parénquima y vasos cerebrales (Sturchler-Pierrat et al., 1997; Calhoun et al., 1999). En el caso de la AAC, también se ha propuesto que las células del músculo liso de arterias cerebrales podrían contribuir a la producción del péptido A β cerebral (Wisniewski et al., 1995).

Fisiológicamente los niveles que se producen del péptido A β son eliminados del cerebro por diferentes vías. En las formas de AAC o EA familiares, con un componente genético (con mutaciones puntuales en los genes APP, PS1 o PS2), los niveles de A β producidos a nivel cerebral se encuentran incrementados (Hardy y Selkoe, 2002). En cambio, en casos de EA o AAC esporádico, se cree que la acumulación de A β cerebral se produce por una deficiencia en los mecanismos que permiten su salida del cerebro, más que de su excesiva producción (Mawuenyega et al., 2010).

3.1.3 Eliminación de A β cerebral

El péptido A β es producido principalmente por las neuronas y se libera al líquido intersticial cerebral. Los mecanismos de acumulación cerebral de A β y la eficiencia con la que se elimina del fluido intersticial están regulados principalmente por cuatro mecanismos: 1) endocitosis intracelular, 2) degradación enzimática, 3) por drenaje perivascular hacia LCR y, 4) eliminación al torrente sanguíneo (Figura 6).

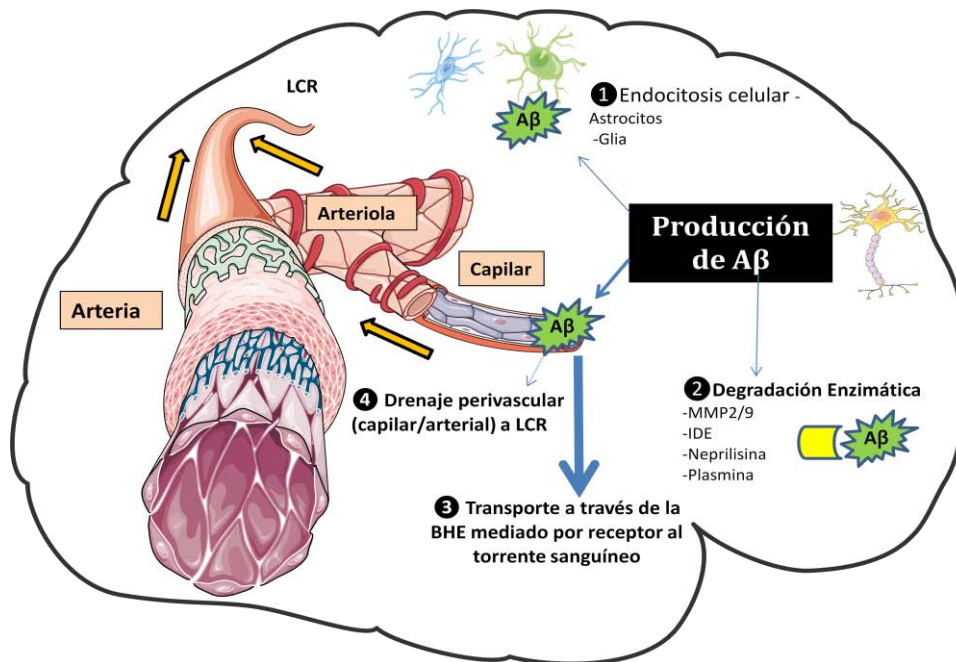


Figura 6 Sistemas de eliminación de A β en cerebro. El A β producido por las neuronas se difunde por el fluido intersticial cerebral. Éste puede ser eliminado por proteólisis enzimática, por endocitosis celular o por transporte, mediante el drenaje perivascular y eliminación por el LCR, y a través de la BHE al torrente sanguíneo.

En primer lugar, el material amiloide se elimina por endocitosis intracelular, principalmente por parte de astrocitos o células de la microglia (Schenk et al., 1999; Wyss-Coray et al., 2003). Además, el péptido A β se puede catabolizar por degradación enzimática, principalmente las proteasas implicadas son la neprilisina (Kanemitsu et al., 2003), que degrada monómeros y oligómeros de A β , y la enzima degradadora de insulina (IDE) (Farris et al., 2003), capaz de degradar sólo monómeros. Otras enzimas como MMP2 y 9 (Roher et al., 1994; Yan et al., 2006; Miners et al., 2008; Hernandez-Guillamon et al., 2010) y plasmina (Tucker et al., et al., 2000; Miners et al., 2008) también se ha descrito que contribuyen a la degradación enzimática de los péptidos A β , lo cual permite la regulación de los niveles basales y evitan su agregación. Sin embargo, las vías más importantes en la eliminación del péptido A β se basan en su transporte a dos niveles: mediante el drenaje perivascular al LCR (Weller et al., 1998), o al torrente sanguíneo a través de la BHE mediante el transporte específico a través de receptores (Figura 6).

En esta tesis, nos hemos centrado en el estudio de algunos de los mecanismos implicados en el transporte del péptido A β (1-40) mediante un modelo experimental *in vitro* de BHE.

3.2. La barrera hematoencefálica

Los principales componentes que forman la BHE son las células endoteliales, la lámina basal, los pericitos y astrocitos. A diferencia de los capilares periféricos, los capilares cerebrales presentan una baja permeabilidad a sustancias no solubles o liposolubles y de alto peso molecular, así como un transporte altamente específico (Figura 7). A continuación se describirá más detalladamente estas características.

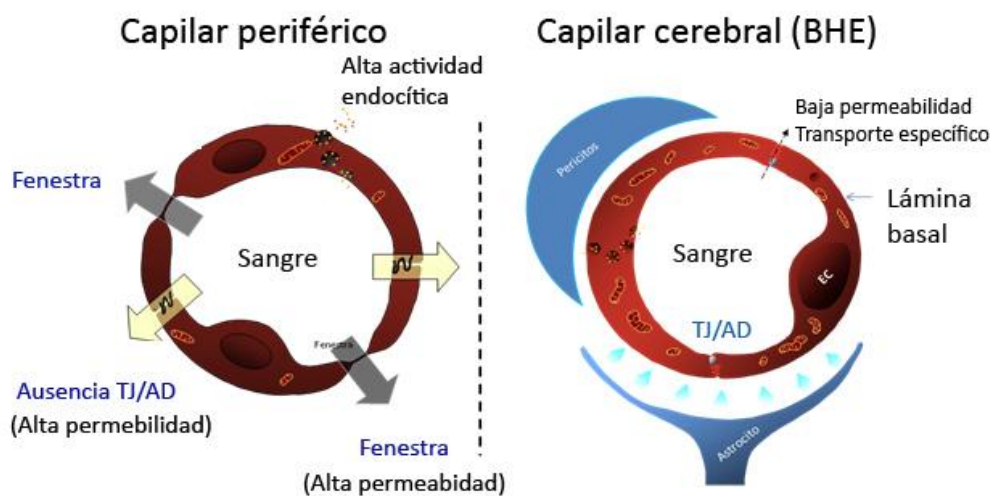


Figura 7 Diferencias en la estructura de un capilar periférico y cerebral. A la izquierda se muestra el capilar periférico, con presencia de fenestras y espacios intercelulares entre las células endoteliales que lo forman. Esta estructura permite un incremento en la permeabilidad y el transporte de sustancias. A la derecha, la representación de la BHE, con las células endoteliales ancladas a la lámina basal, unidas entre ellas por proteínas ocluyentes y adherentes, y en estrecho contacto con pericitos y podocitos de astrocitos. Estas características estructurales conceden a la BHE una baja permeabilidad a sustancia de alto peso molecular y transporte específico mediado por receptor.

Las células endoteliales de la vasculatura cerebral tienen como función común a las células endoteliales de los órganos sistémicos la homeostasis, regulación del riego sanguíneo y la regulación de la trans migración leucocitaria. Sin embargo, las células endoteliales cerebrales difieren de las otras en: 1) la presencia de una continua expresión de proteínas tipo TJ (occludinas y claudinas) y adherentes (AJ, *Adheren Junctions*) que confieren una baja permeabilidad paracelular hidrofílica, dando lugar a una restricción del transporte y limitando el proceso de endocitosis; 2) la ausencia de fenestraciones; 3) una alta expresión de transportadores específicos que hacen que el transporte a través de la barrera sea altamente específico; 4) la presencia de enzimas metabolizantes (Cecchelli et al., 1999; Cecchelli et al., 2007).

Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral tienen una alta resistencia eléctrica, una baja actividad pinocítica y una relación mitocondria/citoplasma alta debido a la elevada actividad metabólica (Oldendorf et al., 1977; Abbott et al., 2002; Abbott et al., 2006). Dichas células presentan una polaridad estructural y funcional entre su membrana plasmática luminal (cara apical o plasmática) y abluminal (cara basolateral o cerebral), en lo que refiere a proteínas de unión estrecha (TJ y AD), transportadores y enzimas, lo cual contribuye al correcto funcionamiento de la BHE.

Las TJ y AD son proteínas transmembrana que interaccionan con proteínas de las células adyacentes y ocluyen la ruta paracelular y restringen el proceso de transcitosis. Pero además, también existe una barrera enzimática capaz de restringir la entrada de compuestos sanguíneos mediante su metabolismo. Tal metabolismo puede degradar compuestos neuroactivos, así como también facilitar su eliminación de cerebro a sangre, convirtiéndolos en substratos para los transportadores de eflujo de la BHE. Esta barrera está constituida por la gamma-glutamil transpeptidasa, la fosfatasa alcalina, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, el citocromo P450, entre otras enzimas que están en alta concentración en la microvasculatura cerebral en comparación con la microvasculatura de otras regiones (Pardridge, 2005).

Subyacente a las células endoteliales polarizadas, se encuentra la membrana basal, constituida fundamentalmente por lamininas, colágeno tipo IV y heparán sulfato (Engelhardt & Sorokin, 2009). Las lamininas son glicoproteínas capaces de interaccionar con receptores presentes en distintos tipos celulares como células endoteliales, astrocitos o pericitos (Engelhardt & Sorokin, 2009). Las células endoteliales se anclan a la lámina basal, la cual influye en la expresión de las TJ (Tilling et al., 1998) y tiene un papel crucial en el mantenimiento de la BHE.

En cuanto a los otros componentes celulares de la BHE, cabe destacar la presencia de los pericitos y astrocitos. Los pericitos son células morfológicamente, bioquímicamente y fisiológicamente muy heterogéneas, que rodean y envuelven a las células endoteliales, localizados predominantemente en capilares y escasamente distribuidos en vénulas y arteriolas. Si bien están presentes en la mayoría de los tejidos del organismo, la densidad de pericitos se estima que es mayor en la retina y en el cerebro respecto a otros órganos (Frank et al., 1987; Shepro & Morel, 1993). Algunas funciones que se les han atribuido son: la regulación de la proliferación y diferenciación endotelial; sintetizar y secretar gran variedad de agonistas autoreguladores vasoactivos; sintetizar y liberar constituyentes de la

membrana basal y matriz extracelular (colágeno tipo IV, glicosaminoglicanos y laminina); sintetizar y liberar factores de crecimiento y moléculas capaces de regular la permeabilidad, la maduración y estabilidad vascular, y la angiogénesis (Shepro & Morel, 1993; Lai y Kuo, 2005; Dore-Duffy, 2008).

Por último, los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y recubren más del 99% de la superficie capilar (Hawkins y Davis, 2005). Son células estrelladas con múltiples y finas prolongaciones con características propias según su localización. Los astrocitos son células polarizadas, debido a su localización estratégica, y son esenciales en el acoplamiento entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo (Abbott et al., 2006). Los podocitos o pies terminales de los astrocitos recubren casi la totalidad de la superficie capilar y están en estrecho contacto con células endoteliales y pericitos. Muchos trabajos aportan evidencias acerca del papel de los astrocitos en la inducción y mantenimiento de la BHE (Haseloff et al., 2003; Abbott et al., 2002; Abbott et al., 2006). Así, los astrocitos pueden liberar varios factores importantes en la inducción y mantenimiento de la BHE, como el TGF- β y el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF, *Glial-Derived Neurotrophic Factor*) que son importantes para la formación de uniones ocluyentes en células endoteliales cultivadas (Abbott et al., 2002; Abbott et al., 2006; Haseloff et al., 2003).

3.3. Transporte de A β a nivel de BHE

La eliminación del péptido A β a través de la BHE está influenciada principalmente por la expresión de los receptores endoteliales LRP1 (Zlokovic et al., 2010) y LRP2 (Marzolo y Farfán, 2011; Stanimirovic y Friedman, 2012) implicados en el eflujo (eliminación) de cerebro a sangre; y el receptor RAGE implicado en el influjo (entrada) de sangre al cerebro (Deane et al., 2003). También se ha descrito que la expresión y actividad de proteínas de la familia de transportadores ABC y la bomba de eflujo Pg-P (del inglés, *permeability glycoprotein*) o el receptor LRP8 (Stanimirovic y Friedman, 2012) podrían modular el transporte de A β a través de la BHE. Además, las proteínas transportadoras de A β , como las Apolipoproteínas E (ApoE) y J (ApoJ) (Zlokovic et al., 1996; Calero et al., 2009; Bu, 2009) podrían intervenir en el transporte polarizado de los péptidos a través de los capilares cerebrales (Figura 8).

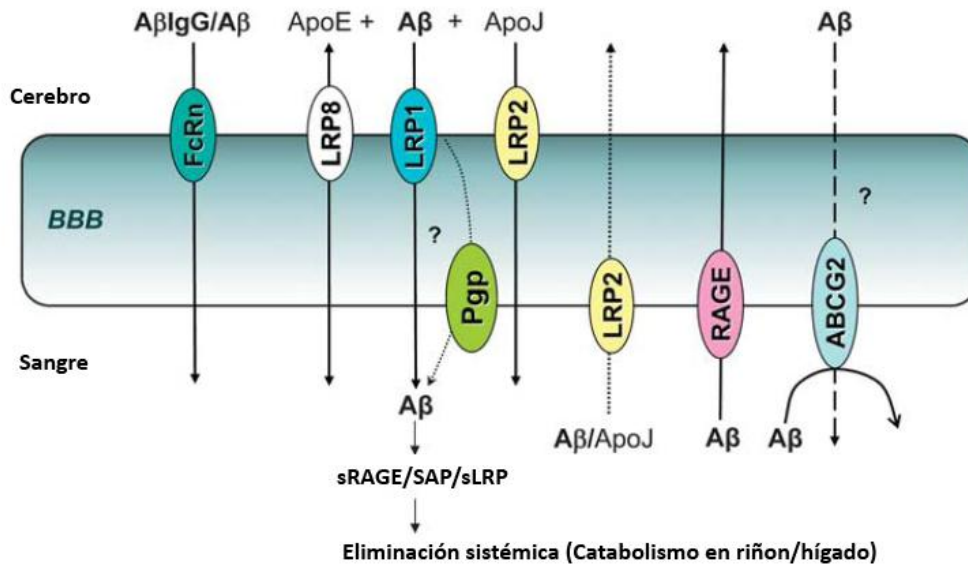


Figura 8 Esquema representativo del transporte de A β a nivel de BHE. La entrada de A β (de sangre al cerebro) está mediada principalmente por el receptor RAGE. Su salida, de cerebro a sangre, está básicamente mediado por el receptor LRP1 y LRP2 (por la formación del complejo A β -ApoJ). Por vía LRP8, A β es transportado en forma libre o unido a ApoE2y3. Inmunocomplejos formados con A β , pueden ser eliminados por transcitososis via FcRn o LRP1. A nivel sistémico, A β puede unirse a las formas solubles de RAGE, LRP1, al componente P sérico (SAP) y es transportado hasta el riñón y hígado donde se cataboliza. BBB, del inglés *Blood Brain Barrier*=BHE. (Adaptado de Stanimirovic y Friedman, 2012)

RAGE es un receptor multiligando de la familia de las inmunoglobulinas (Neeper et al., 1992:), expresado en diferentes tipos celulares cerebrales como células endoteliales, pericitos, neuronas, glia y células del músculo liso vascular (Yan et al., 1996; Yan et al., 2010; Sturchler et al., 2008). La interacción de RAGE con sus ligandos, como son monómeros o oligómeros de A β , activa diferentes vías de transducción que dan lugar a un incremento del estrés celular en la EA (Bierhaus et al., 2005; Smichdt et al., 2009). Por otro lado, mediante el procesamiento proteolítico, se puede formar la forma soluble sRAGE excretada en el torrente sanguíneo, que se cree que contribuiría a la eliminación sistémica (teoría “sink”) de A β (Zlokovic et al., 2003; Tarasoff-Conway et al., 2015). Como hemos mencionado, a nivel de la BHE, actúa como receptor en el proceso de influjo de A β circulante al cerebro. Este proceso provoca por un lado una activación endotelial y una respuesta neuroinflamatoria (Deane et al., 2003) y, por otro, desencadena una señalización celular que lidera el tráfico de monocitos a través de la BHE (Giri et al., 2000). Dada la activación de vías moleculares relacionadas con el estrés oxidativo, celular e inflamación activadas por RAGE a nivel de BHE, glia y neuronas, y su incremento de expresión a nivel vascular en condiciones patológicas en la EA (Yan et al., 1996; Deane et al., 2003), se ha

postulado la inhibición de RAGE como una diana terapéutica para prevenir el acumulo de A β cerebral en esta enfermedad (Deane et al., 2003; Webster et al., 2012).

El LRP1 es un receptor de la familia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con diferentes funciones entre las cuales está la regulación del metabolismo del colesterol y lipoproteínas, coagulación, transmisión sináptica, tráfico y metabolismo de APP y eliminación de A β cerebral (Herz, 2001; Herz y Strickland, 2001; Herz et al., 2009). Se expresa en la mayoría de células de la unidad neurovascular: células endoteliales, células del músculo liso vascular cerebral, pericitos, astrocitos y neuronas (Herz y Bock, 2002). LRP1 se encuentra en forma transmembrana o soluble en la circulación; la proteína transmembrana consta de un dominio extracelular que une a sus ligandos y otro citoplasmático necesario para una rápida endocitosis de éstos (Deane et al., 2004; Li et al., 2001). La expresión de LRP1 transmembrana está controlada a nivel transcripcional y translacional por su dominio extracelular por proteólisis (Selvais et al., 2011) y la unión a sus ligando puede ser bloqueada por la proteína RAP (del inglés, *Receptor-associated protein*) (Hertz et al., 1991). Mediante proteólisis y bajo algunas condiciones, se produce la forma soluble. Ésta es secretada a plasma y conserva los dominios de unión a los ligandos, por lo que permite intervenir en procesos de eliminación de sus ligandos a nivel sistémico (Quinn et al., 1997).

Algunos estudios muestran como LRP1 transporta A β a través de la BHE, incluyendo A β en forma libre (Deane et al., 2004; Shibata et al., 2000) y ApoE2/E3 lipidada o no lipidada en forma libre o en forma de complejo con A β (Deane et al., 2008). Así, mediante la inyección intracerebral de A β en ratón o en un modelo animal de EA (Tg-2576: sobreexpresión de APP de origen neuronal), se ha demostrado que LRP1 está expresado en el espacio abluminal endotelial (cara basolateral) y es el receptor principal implicado en la eliminación rápida de A β cerebral al torrente sanguíneo (Deane et al., 2004; Deane et al., 2008; Shibata et al., 2000; Bell et al., 2007; Ito et al., 2006). Por su parte, algunos estudios han demostrado que la expresión de LRP1 a nivel vascular disminuye con la edad, con la EA o en AAC en humanos (Kang et al., 2000; Shibata et al., 2000; Bading et al., 2002; Deane et al., 2004; Donahue et al., 2006; Bell y Zlockovic, 2009), siendo una de las causas de la acumulación parenquimal/vascular de A β en estos pacientes (Deane et al., 2004; Donahue et al., 2006).

El tercer receptor a destacar es el LRP2, también conocido como Megalin. Es un receptor transmembrana que pertenece al grupo de los receptores LDL y une diferentes ligandos, entre ellos ApoE o ApoJ (Willmow et al., 1992; Marzolo y Farfán, 2011; Spuch et al., 2012;),

RAP (Bu y Marzolo, 2000), entre otros. La expresión de LRP2 está altamente restringida en el epitelio de los diferentes órganos y tejidos, sobretodo expresada en la cara apical (Marzolo y Farfán, 2011). Aúna sí, también se ha descrito que la localización de LRP2 en la cara apical o basolateral dependerá de la unión de algunos ligandos o condiciones en el medio (Marzolo et al., 2003; Marzolo y Farfán, 2011). En el SNC, se expresa en neuronas, astrocitos, en células endoteliales que forman la BHE y en el epitelio del plexo coroideo que forma la barrera entre sangre y LCR (B-CSFB, *Blood-cerebrospinal fluid barrier*) (Spuch and Navarro, 2010; Spuch et al., 2012a). Así, Megalin jugaría un papel muy importante a nivel de BHE y B-CSFB en la eliminación de A β de cerebro a sangre (transporte de eflujo cerebral) en la EA (Spuch and Navarro, 2010a;b). De hecho, en pacientes de EA se ha determinado que los niveles de LRP2 en ambas barreras se encuentran disminuidos (Zlokovic et al., 1996; Spuch y Navaroo, 2010b). A nivel genético, se determinó que un SNP en el gen LRP2 confiere un riesgo a la aparición de EA (Vagas et al., 2010). Por todo ello, LRP2 podría tener un uso terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas (Spuch y Navarro, 2010b).

3.3.1. Apolipoproteínas (ApoE, ApoJ y ApoA-I) y su relación con el transporte y metabolismo de A β

Como ya hemos mencionado, la rápida formación de fibras amiloideas y la alta insolubilidad y toxicidad de éstas, hace que las proteínas que son capaces de unirse al péptido A β , evitar su agregación y modular su transporte pueden ser potentes enfoques terapéuticos para las enfermedades amiloidogénicas. En este sentido, como veremos en esta sección, existe una creciente evidencia de que las apolipoproteínas están implicadas en la fibrillogénesis y transporte de A β a nivel cerebral. Las apolipoproteínas son las proteínas que forman las lipoproteínas y son requeridas para solubilizar los lípidos no solubles para ser transportados y reconocidos por sus receptores específicos. Las lipoproteínas están compuestas por un corazón lipídico (no polar), triglicéridos y colesterol esterificado, y su superficie está formada por una monocapa de apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol no-esterificado. Existen muchas apolipoproteínas, de las cuales la ApoE, ApoJ y ApoA-I han sido relacionadas con el transporte, la eliminación y/o el proceso de agregación del péptido A β (Mahley y Rall, 2000; Ladu et al., 2000).

A pesar del gran interés puesto en el estudio de la ApoE en el contexto de la β -amiloidosis cerebral, no está claro del todo su papel en el desarrollo de la EA y AAC. En estudios in vitro, por ejemplo, se ha demostrado que la ApoE promueve la fibrilación de A β 42 y A β 40, siendo la isoforma ApoE4 la más pro-fibrillogénica (Wisniewski et al., 1994). En modelos animales transgénicos para APP, se ha observado que una delección de este gen evita el

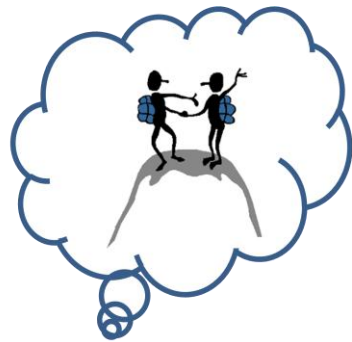
desarrollo de AAC y la aparición de HIC (Holtzman et al., 2000; Fryer et al., 2003), como también reduce los depósitos vasculares y retrasa la edad de aparición de placas parenquimales, en comparación a ratones que expresan ApoE según la isoforma (ApoE4>ApoE3>ApoE2) (Fryer et al., 2005; Bales et al., 2009). Se ha propuesto que las interacciones físicas ApoE-A β influyen en el metabolismo/eliminación del péptido. A nivel de transporte, se ha observado que las isoformas ApoE2 y 3 pueden ser eliminadas a nivel cerebral, en forma libre o en complejo con A β (Grinberg y Thal, 2010), al espacio perivascular o a través de la BHE mediante los receptores LRP1 (Deane et al., 2008), LRP2 (Marzolo et al., 2011; Spuch y Navarro 2010) y LRP8 (Stanimirovic y Friedman, 2012). En modelos de BHE *in vitro*, se ha visto que la eliminación A β es dosis e isoforma dependiente; dosis altas y la isoforma ApoE4 restringen el transporte (Bachmeier et al., 2010), así como si la proteína se encuentra lipidada o no (Bell et al., 2007). Por el contrario, un estudio más reciente ha puesto de manifiesto que la interacción de ApoE-A β es mínima en condiciones fisiológicas en solución o en el LCR humano y que la regulación del metabolismo de A β por ApoE vendría dada por la competición entre ellos por el receptor LRP1 en astrocitos (Verghese et al., 2013).

Por su parte, la ApoJ (también conocida como Clusterin) es una chaperona que está asociada a lípidos. A nivel cerebral, se expresa principalmente en neuronas y astrocitos (Charnay et al., 2008). En el contexto de enfermedades con un acumulo de A β cerebral, ApoJ se ha encontrado unida al péptido A β en plasma (Koudinov et al., 1998), LCR (Yang et al., 2015), en placas seniles en cerebros de pacientes con EA, así como en los vasos cerebrales en casos de AAC (Matsubara et al., 1996) Su implicación con la EA se enfatizó cuando se describió que varios SNPs en el correspondiente gen CLU se asociaban con el riesgo a padecer la enfermedad (Lambert et al., 2009). Aunque los alelos de riesgo de estas variants génicas se han asociado a niveles más bajos de proteína ApoJ plasmática (Schürmann et al., 2011), cómo estos SNPs suponen un factor de riesgo de la EA aún no está del todo esclarecido. Se ha observado que altos niveles de ApoJ en plasma están asociados con mayor severidad y prevalencia de EA (Schrijvers et al., 2011). En el caso de pacientes con probable o posible AAC, nuestro grupo ha descrito un ligero incremento de sus niveles plasmáticos en comparación con pacientes con EA o controles (Montañola et al., 2015). Por otro lado, en estudios en modelos animales transgénicos para APP, se observó que la ausencia de ApoJ reducía las placas fibrilares, sin alterar la carga total de A β cerebral (DeMattos et al. 2002,2004). Por el contrario, en un modelo de ratón deficiente para ApoE, la supresión de la expresión de ApoJ se asoció a una reducción en la edad de inicio en el

desarrollo de la enfermedad, así como un incremento notable en la acumulación de A β (DeMattos et al. 2004). En estudios *in vitro*, se ha observado que ApoJ inhibe la agregación y toxicidad de A β uniéndose a él (Ghisso et al., 1993; Paula-Lima et al., 2009) y lo protege de la degradación proteolítica (Matsubara et al. 1995). Sin embargo, la ratio ApoJ/ A β oligomérico parece ser crucial para la inhibición de la formación de fibras amiloides (Yerbury et al., 2007). Por otro lado, ApoJ no sólo se ha relacionado con el transporte A β periférico, sino también con la eliminación de A β a través de la BHE. Se ha propuesto que los complejos ApoJ-A β mejorarían la eficiencia de la eliminación cerebral del péptido principalmente mediante su transporte a través de la BHE (Bell et al., 2007). Como ya hemos comentado, se ha demostrado que el complejo ApoJ-A β 40 es permeable a través del receptor LRP2, tanto en la entrada (Zlokovic et al., 1996) como en la salida (Bell et al., 2007) del cerebro.

Por último, la ApoA1 es la apolipoproteína menos estudiada en el contexto del SNC y su relación con la EA y AAC. Aunque el rol de ApoA1 en el sistema periférico y enfermedades cardiovasculares ha sido extensamente examinado, existen pocos estudios dirigidos a las enfermedades cerebrovasculares. ApoA1 es el componente principal de las HDLs (*High Density Lipoprotein*) en plasma, implicada en el transporte de colesterol de los tejidos periféricos al hígado y riñones. Aunque ApoA1 es sintetizada principalmente por el hígado, a nivel cerebral, se ha encontrado en LCR y co-localizada en las placas seniles en EA (Harr et al., 1996). El origen de la ApoA1 cerebral aún no está del todo claro, aunque se ha sugerido que podría ser sintetizada por células endoteliales cerebrales (Gosselet et al., 2009; Möckel et al., 1996) o podría provenir de la sangre cruzando la BHE (Stukas et al., 2014). Hay algunos estudios que han resaltado el papel que juegan las HDLs y la ApoA1 en patologías asociadas al depósito de A β cerebral. En estudios clínicos, se ha reportado que los pacientes con EA presentaban niveles plasmáticos de ApoA1 más bajos (Kawano et al., 1995; Saczynski et al., 2007), y se ha propuesto que SNPs en el gen ApoA1 podrían ser un factor de riesgo de EA (Vollbach et al., 2005). Por otro lado, *in vitro*, se ha observado que la unión de ApoA1 - A β conduce a la reducción de la toxicidad y agregación del péptido (Koldamova et al., 2001). Además, estudios utilizando animales modificados genéticamente, han descrito que la delección de ApoA1 en un modelo experimental de EA lleva a un empeoramiento del déficit cognitivo, y aunque no altera la carga total de A β (Fagan et al., 2004), la ratio A β 40:42 incrementa dando lugar a la acumulación vascular y la aparición de AAC (Lefterov et al., 2010). A su vez, la sobreexpresión de ApoA1 en estos modelos, mejora el estado cognitivo de los animales, sin observarse cambios en el número

o densidad de placas parenquimales, pero con una reducción significativa del A β vascular (Lewis et al., 2010). De este modo, estos estudios asocian la ApoA1 plasmática con la carga vascular amiloide y la inflamación asociada a la AAC. De hecho, nuestro grupo ha demostrado que niveles de ApoA1 periféricos se correlacionan específicamente con los niveles de péptido A β (1-40) en pacientes AAC, lo que sugiere que ApoA1 actuaría como transportador fisiológico de A β (1-40) en plasma (Montañola et al., 2015).



Objetivos

Objetivo general:

Las diferencias fisiopatológicas existentes según el tipo y la etiología del ictus condicionan la expresión de diferentes proteínas, tanto a nivel cerebral como a nivel sistémico. Estas moléculas pueden tener utilidad clínica como biomarcadores para un mejor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, y podrían considerarse nuevas dianas terapéuticas y/o ayudar a esclarecer los procesos patológicos subyacentes. Por ello, el objetivo global de esta tesis es identificar nuevas proteínas implicadas en la fisiopatología de la hemorragia cerebral y determinar su relevancia mediante el estudio funcional en diferentes modelos experimentales.

Objetivos específicos:

1. Búsqueda sistemática y construcción de una página web que recoja información actualizada sobre biomarcadores en el ictus hemorrágico, y en particular sobre biomarcadores que permitan diferenciar el ictus isquémico del hemorrágico.
2. Identificación de proteínas implicadas en la fisiopatología de la hemorragia intracerebral primaria según su etiología mediante el *screening* masivo de transcritos diferencialmente expresados en células sanguíneas de pacientes con una HIC de origen hipertensivo o diagnosticados de probable Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC).
3. Identificación de moléculas implicadas en los efectos deletéreos sobre el endotelio cerebral inducidos por el tratamiento con Activador Tisular del Plasminógeno recombinante (r-tPA): subestudio funcional de una proteína candidata en modelos experimentales de isquemia cerebral y valoración de su implicación clínica mediante la determinación de sus niveles plasmáticos en pacientes con ictus isquémico agudo y transformación hemorrágica tras el tratamiento trombolítico.
4. Estudio de la modulación del transporte del péptido beta-amiloide(1-40) por las apolipoproteínas ApoJ y ApoA1 recombinantes humanas en un modelo in vitro de barrera hematoencefálica, como paradigma pre-clínico para diseñar futuras estrategias terapéuticas para la AAC y la beta-amiloidosis cerebral.



Resultados

Copia de las publicaciones

ARTÍCULO 1**Identification of Plasma Biomarkers of Human Intracerebral Hemorrhage Subtypes through Microarray Technology.**

J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016 Mar;25(3):665-71.

Identification of Plasma Biomarkers of Human Intracerebral Hemorrhage Subtypes through Microarray Technology

Cristina Merino-Zamorano, MSc,* Pilar Delgado, MD, PhD,*
 Sofía Fernández de Retana, MSc,* Israel Fernández-Cadenas, PhD,*
 David Rodríguez-Luna, MD, PhD,† Joan Montaner, MD, PhD,*† and
 Mar Hernández-Guillamon, PhD*

Background: Intracerebral hemorrhage (ICH) is a devastating form of stroke and depending on the underlying cause, primary ICH is mainly caused by hypertension (HTN-ICH) or cerebral amyloid angiopathy (CAA-ICH). Currently, neuroimaging markers are required to identify the pattern for each etiology. The discovery of new biomarkers to improve the management of this pathology is therefore needed. *Methods:* A microarray analysis was carried out to analyze gene expression differences in blood samples from patients (>1.5 months since the last ICH event) who suffered a CAA-ICH and HTN-ICH, and controls. The results were replicated by quantitative polymerase chain reaction and the plasma protein level of the best candidate was measured with enzyme-linked immunosorbent assay. *Results:* The microarray analysis and the validation study revealed an increase in Golgin A8 Family, Member A (GOLGA8A) mRNA and protein levels in ICH cases compared to controls ($P < .01$), although no differences were found between specific ICH etiologies. GOLGA8A plasma levels were also associated with the presence of multiple hemorrhages ($P < .05$). *Conclusions:* The GOLGA8A level was increased in the blood of patients who suffered a primary ICH. We did not, however, find any candidate biomarker that distinguished CAA-ICH from HTN-ICH. The role of GOLGA8A in this fatal disorder has yet to be determined. **Keywords:** Intracerebral hemorrhage—stroke—biomarker—cerebral amyloid angiopathy—hypertensive-related hemorrhage—microarray analysis.

© 2015 National Stroke Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

From the *Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and †Neurovascular Unit, Neurology Department, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain.

Received June 3, 2015; accepted November 22, 2015.

Source of funding: The Neurovascular Research Laboratory takes part in the INVICTUS network (RD12/0014/0005). This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias INTRASALUD PI 11/0176, financed by the Institute of Health Carlos III, Spain. C.M.-Z. is supported by the fellowship grant FI12/00089, and M.H.-G., P.D., and I.F.-C. by the Miguel Servet programme (CP12/03259, CP09/136, and CP12/03298, respectively) from the Institute of Health Carlos III, Spain.

Address correspondence to Mar Hernández-Guillamon, PhD, Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: mar.hernandez.guillamon@vhir.org.

1052-3057/\$ - see front matter

© 2015 National Stroke Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.11.032>

Introduction

Primary intracerebral hemorrhage (ICH) accounts for 10%-15% of all strokes and is associated with poor functional outcome and higher morbidity and mortality rates than ischemic stroke. Currently, no effective treatment exists for ICH; the medical care given in the stroke unit is therefore a determining factor that influences its morbidity and mortality.¹

Primary ICH is mainly caused either by hypertension (HTN) or cerebral amyloid angiopathy (CAA). Typically, CAA-related ICH can be distinguished from HTN-related ICH by computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging. Whereas HTN is the leading risk factor for ICH-related bleeding in deep areas of the brain,² the localization of CAA-associated hemorrhages occurs most commonly in the cerebral lobes.³ Chronic HTN is the underlying pathology that leads to HTN-ICH disease; it induces degeneration of the walls of arteries and arterioles, thereby promoting the formation of microaneurysms and lipohyalinosis.^{4,5} By contrast, in CAA-ICH pathology, the deposition of amyloid protein within the walls of the cerebral cortex and leptomeninges vessels³ causes a loss of smooth muscle cells in the tunica media, inducing a vascular dilatation and fibrinoid necrosis in the most affected vessels.^{3,6} The presence of recurrent hemorrhages⁷ and multiple lobar microbleeds⁸ is more prevalent in patients with CAA-related ICH than in patients with HTN-ICH.

Several studies have revealed an important role for inflammation in brain damage induced by ICH. The activation of cell immunity and the release of inflammatory cytokines are both known to contribute to ICH pathogenesis.⁹ The purpose of this study is to differentiate between CAA-ICH and HTN-ICH based on differences in gene expression in white blood cells. The identification of molecules related to the etiology of primary ICH will provide us with a better understanding of the pathology and progress of ICH and will aid us in the discovery of new molecular targets for future treatments.

Materials and Methods

Study Population

Patients older than 55 years who presented at Vall d'Hebron Hospital between 2006 and 2012 and were diagnosed with primary ICH were recruited during their follow-up visit (at least 1.5 months after the ICH). Patients who met the study criteria and who agreed to participate were included (n = 23). In those cases, a detailed history of vascular risk factors and the number of previous ICHs were registered for all cases. During this follow-up visit, blood samples were collected for biological analysis. ICH patients were followed for 51.1 ± 36.2 months to detect recurrent ICH events. Control participants included in the study were non-stroke

volunteers matched by sex and age with ICH participants (n = 11).

Diagnosis was made by CT scan on admission. Patients with clinical suspicion of CAA also underwent a brain multiecho gradient echo T2-weighted imaging magnetic resonance imaging with CT angiography or magnetic resonance angiography when appropriate. CAA-related ICH (CAA-ICH) was defined as a lobar, cortical or cortico-subcortical hemorrhage, in the absence of another cause of hemorrhage, according to Boston criteria.¹⁰ When patients were hypertensive and the hemorrhage was detected in deep areas (basal ganglia, thalamus, or brain stem), the ICH was associated with a hypertensive vasculopathy (HTN-ICH). HTN was defined in patients with a history of HTN, who were under antihypertensive treatment or had documented elevated blood pressure (systolic ≥ 140 or diastolic ≥ 90 mmHg) prior to ICH. Patients with an ICH related to vascular malformation, impaired coagulation or oral anticoagulant intake, traumatic brain injury, and tumoral bleedings, and patients who underwent a surgical procedure were all excluded. The modified Rankin Scale score was recorded to assess functional outcome 3 months after the ICH onset. ICH residual cavity volume in the chronic phase (at least 1.5 months after the last ICH) was measured according to the validated formula $ABC/2$,^{11,12} where *A* and *B* represent the largest perpendicular diameters through the hypodense area on the CT scan, and *C* represents the thickness of ICH (the number of 10-mm slices containing the hemorrhage). This study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospital, and informed and written consent was acquired from all patients or their relatives and controls.

Biological Samples

Plasma and RNA samples were extracted from whole blood. Briefly, blood was drawn into EDTA-containing tubes and centrifuged at 1500 *g* for 15 minutes at 4°C, obtaining plasma and white blood cells (buffy coat fraction) samples. Plasma samples were frozen at -80°C until needed. The buffy coat fraction was immediately mixed with RNeasy lysis buffer (Qiagen, Crawley, UK) and samples were frozen at -80°C until processed. RNA from white blood cells was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Austin, TX), following manufacturer instructions. The quality of the RNA was assessed using the Bioanalyzer Nanochip platform (Agilent, Santa Clara, CA).

Microarray Analysis

Five patients from each group (CAA-ICH, HTN-ICH, and non-stroke controls) balanced by sex and age were included in the analysis. From total purified RNA, cDNA was synthesized and biotin-labeled complementary cRNA was synthesized from the cDNA. Gene expression profiles were obtained using a GeneChip® Human Exon 1.0

ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA). All samples demonstrated characteristics of high-quality cRNA and were subjected to subsequent analysis. Raw expression values were preprocessed using the RMA method, a 3-step process that integrates background correction, normalization, and summarization of probe values. The selection of differentially expressed genes between conditions was based on a linear model analysis with empirical Bayes moderation of the variance. Transcripts selected as being differentially expressed were clustered to look for common patterns of expression. Hierarchical clustering was used to form data into Venn diagrams and heat maps (color-coded graphs with samples in columns and genes in rows). Statistical analyses were performed using the language R and the libraries were developed for microarray data analysis by the Bioconductor Project (www.bioconductor.org) of the Statistics and Bioinformatics Unit of the Vall d'Hebron Research Institute.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

A replication study was performed by qRT-PCR using RNA samples from a new cohort of 18 patients also balanced by sex and age. qRT-PCR reactions were run in triplicate and analyzed using Applied Biosystems SDS 7900 system software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The results were normalized to peptidylprolyl isomerase A (Cyclophilin A, Hs99999904_m1) expression levels. The data are expressed as a ratio of the relative quantification (RQ) obtained using the Livak equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ and using the average expression of a calibrator sample. Candidate genes for the replication study were selected according to the following criteria: (1) non-adjusted *P* value less than .01; (2) $\text{LogFC} > |\pm 5|$, and (3) functional relevance. The selected candidates were neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8 (Hs00362398_m1), methionine sulfoxide reductase A (Hs00737166_m1), GTP cyclohydrolase I feedback regulator (Hs00193360_m1), zinc finger protein 211 (Hs01081444_m1), aminopeptidase-like 1 (Hs00226551_m1), fructosamine 3 kinase (Hs00223368_m1), inositol hexakisphosphate kinase 1 (Hs01051078_m1), RAB3A interacting protein (Hs00223789_m1), Golgin A8 Family, Member A (GOLGA8A, Hs00367259_m1), chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (Hs00277231_m1), and ADAMTS-like 4 (Hs00417524_m1).

Plasma GOLGA8A Determination

GOLGA8A levels were measured in plasma samples by enzyme-linked immunosorbent assay in 96-well microtiter plates (USCN Life Science, Inc., Wuhan, China) following manufacturer instructions. The mean intra-assay coefficient of variation of duplicates was lower than 25%.

Statistical Analyses

Statistical analysis was conducted using the Statistical Package for the Social Sciences software package v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A normality test was performed using the Kolmogorov–Smirnov or Shapiro–Wilk tests. Statistical significance for intergroup differences was assessed by the Student *t*-test, the Mann–Whitney *U*-test, and the Kruskal–Wallis test, as appropriate. Correlations were assessed by Pearson's coefficient. The association between GOLGA8A levels and ICH recurrence was evaluated using a Kaplan–Meier curve (log-rank test). The median was determined to establish the cutoff of GOLGA8A protein level. A *P* value less than .05 was considered statistically significant. The data are expressed as the mean and standard deviation or the median and interquartile range.

Results

Microarray Analysis

A microarray study was performed to carry out a genome-wide comparison aimed at finding transcripts differentially regulated by the pathophysiology of the ICH. All groups comprised 3 males and 2 females and the mean age was not different between groups (75 ± 8.0 years in CAA-ICH cases, 80 ± 8.6 years in HTN-ICH, and 69 ± 7.6 years in controls). **Figure 1, A** shows the heat map diagram, which represents the row data from the microarray analysis. We focused on those transcripts that displayed altered levels of expression in one of the selected groups compared to the rest. A total of 6 transcripts were found to have altered expression in CAA-ICH cases (Group 1), 28 transcripts were differentially expressed in HTN-ICH cases (Group 2), and 31 had altered expression in the control group, compared to ICH cases independent of the etiology (Group 3) (**Fig 1, B**). **Supplemental Table S1** shows the expression levels of all transcripts with differential expression represented in the Venn diagram.

Among the 3 groups, a total of 11 genes were selected for validation by qRT-PCR in a new patient cohort (**Table 1**). Most of the gene expression differences between groups found in the microarray analysis were not confirmed in the replication study. The only gene whose expression levels were significantly different in HTN-ICH patients compared to controls ($P < .05$) in both experiments was GOLGA8A.

GOLGA8A Expression and Association with ICH Occurrence

In contrast to what was found in the microarray analysis, GOLGA8A transcript levels were increased in both CAA-ICH and HTN-ICH cases, compared to controls, in the replication study (RQ CAA-ICH = $1.457 \pm .485$, RQ HTN-ICH = $1.393 \pm .301$, and RQ controls = $.894 \pm .371$; $P < .05$), but no differences were found between etiologies

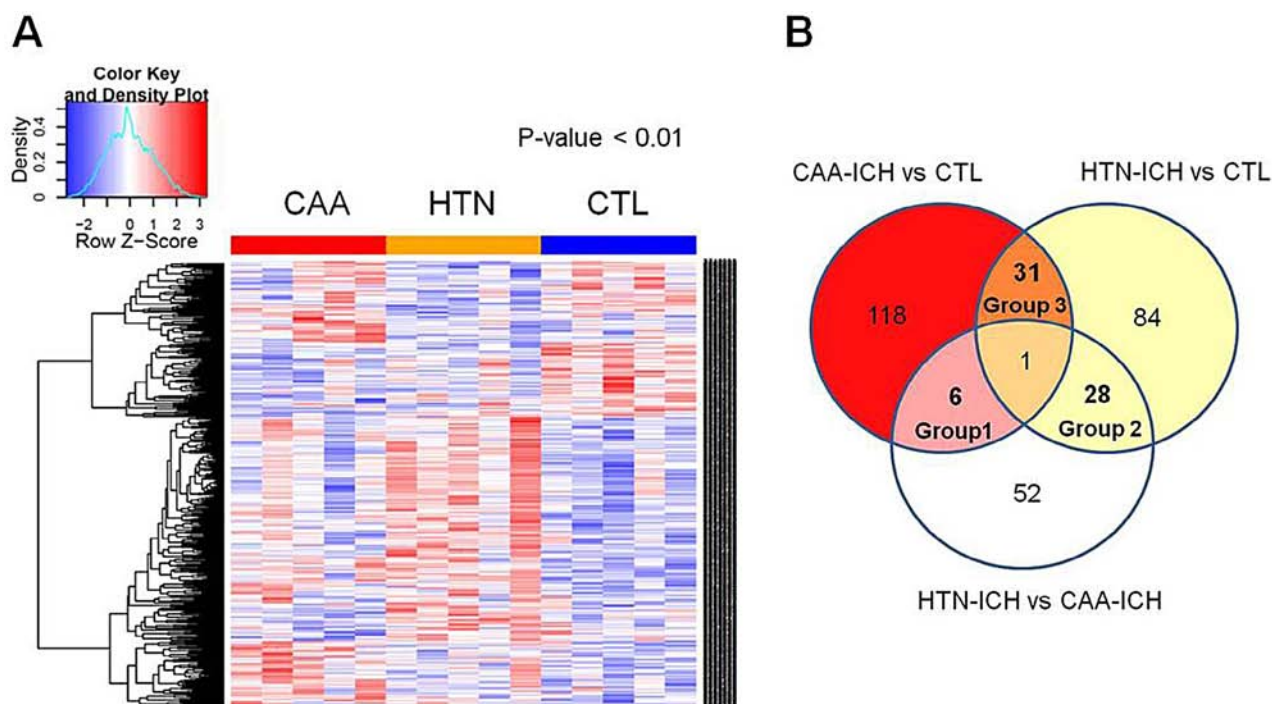


Figure 1. Row data from the microarray analysis and replication study. (A) Heat map and (B) Venn diagram represent the amount of genes differentially expressed in each group. Group 1 is defined as transcripts with altered expression in samples from CAA-ICH patients; Group 2, in HTN-ICH patients; and Group 3 combining both subtypes of ICH. Abbreviations: CAA, cerebral amyloid angiopathy; HTN, hypertension; ICH, intracerebral hemorrhage.

(Fig 2, A). Therefore, GOLGA8A expression was revealed to have an important association with ICH occurrence ($P < .01$) (Fig 2, B). Indeed, GOLGA8A expression was correlated with the number of total hemorrhages and was expressed at an elevated level in patients who suffered multiple ICHs ($n = 5$) compared to controls ($P < .05$) (Fig 2, C).

Next, circulating GOLGA8A protein was evaluated. Plasma levels showed the same profile described in the gene expression study. A significant increase in GOLGA8A protein was found in ICH patients compared to controls (1.16 [0.04-3.35] ng/mL versus .00 [0.00-.42] ng/mL, $P < .01$), although CAA-ICH and HTN-ICH patients presented comparable levels (.85 [0.00-5.53] ng/mL versus 1.79 [0.20-3.06] ng/mL) (Fig 3, A,B). Patients who suffered multiple hemorrhages exhibited higher GOLGA8A plasma levels than controls (Fig 3, C) (1.79 [0.20-3.06] ng/mL versus .00 [0.00-.42] ng/mL, $P < .05$). Among these patients, 87.5% were clinically diagnosed as CAA-ICH-related cases. In this subgroup of patients, those who later suffered a second hemorrhagic event presented a trend toward having higher GOLGA8A plasma levels (>4.004 ng/mL, $P = .091$) (Fig 3, D).

In addition, in the subset of patients studied ($n = 17$), GOLGA8A gene expression and protein concentration were significantly correlated ($R = .664$, $P < .01$). Demographic characteristics and other clinical variables, such as the functional outcome or the residual volume of the hematoma, did not influence GOLGA8A plasma levels (Table 2).

Discussion

Biochemical markers are a useful tool for determining a diagnosis and prognosis for hemorrhagic stroke. They can clarify and identify pathological mechanisms for a better understanding of this disorder and they aid in the characterization of the clinical severity, estimating the risk of progression and long-term prognosis. Prevention strategies that involve the use of biomarkers might help in the management of this disease and in predicting the risk of recurrent ICHs. In the recent years, some advances in the ICH biomarker field have been noticed. The majority of these findings are related to circulating markers that are associated with a prognosis of hemorrhagic stroke,¹³ but few of them address its original diagnosis. Most of these studies describe biological changes in the blood during the acute ICH phase in comparison to non-stroke controls. Some of these molecules altered in ICH patients include MMP-9,¹⁴ osteopontin,¹⁵ copeptin,¹⁶ leptin,¹⁷ matrix Gla protein,¹⁵ s-Fas,¹⁸ fetuin-A,¹⁵ or VAP1 (Vascular Adhesion Protein 1) / SSAO (Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase) activity,¹⁹ among others. On the other hand, different candidates have been proposed to differentiate stroke subtypes, such as glial fibrillary acidic protein,²⁰ S100 calcium-binding protein B/receptor for advanced glycation end products pathway,²¹ or the high-sensitivity C-reactive protein.²²

Our main goal in the present study was to identify potential biological markers that will allow for the differentiation of the 2 main ICH etiologies that are prevalent

Table 1. Replication study results determined by qRT-PCR

Differential group	Gene symbol	Controls (n = 6)	CAA-ICH (n = 6)	HTN-ICH (n = 6)	ICH (n = 12)
1	NEDD8	2.210 (1.075-3.953)	1.134 (.713-2.158)	1.134 (1.038-1.538)	1.245 (.998-1.605)
1	MSRA	.700 (.478-1.175)	1.445 (.709-3.055)	1.135 (.756-3.595)	1.205 (.771-2.870)
1	GCHFR	.962 (.747-1.280)	.669 (.451-1.973)	.750 (.504-1.137)	.740 (.505-1.093)
1	ZNF211	1.32 (.839-2.603)	1.465 (.976-1.780)	2.660 (4.550-.866)	1.575 (1.053-3.303)
2	GOLGA8A	.894 ± .371	1.457 ± .485*	1.393 ± .301*	1.425 ± .386**
2	CCRL2	1.068 (.538-2.052)	1.738 (.857-3.372)	2.501 (1.156-3.330)	2.280 (1.140-3.055)
2	ADAMTSL4	.669 (.157-2.798)	1.013 (.394-4.243)	.341 (.250-.534)	.415 (.340-1.365)
3	NPEPL1	1.200 (.626-2.372)	1.102 (.818-2.465)	1.079 (.908-2.083)	1.079 (.980-1.818)
3	FN3K	1.275 (.158-1.912)	1.890 (1.5200-5.840)	.812 (.299-2.998)	1.725 (.630-3.320)
3	IP6K1	1.668 ± 1.408	1.226 ± .594	1.641 ± .589	1.434 ± .604
3	RAB3IP	2.443 ± 1.784	2.103 ± 1.264	2335 ± 1.603	2.219 ± 1.382

Abbreviations: ADAMTSL4, ADAMTS-like 4; CAA, cerebral amyloid angiopathy; CCRL2, chemokine (C-C motif) receptor-like 2; FN3K, fructosamine 3 kinase; GCHFR, GTP cyclohydrolase I feedback regulator; HTN, hypertension; ICH, intracerebral hemorrhage; IP6K1, inositol hexakisphosphate kinase 1; MSRA, methionine sulfoxide reductase A; NEDD8, neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8; NPEPL1, aminopeptidase-like 1; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RAB3IP, RAB3A interacting protein; ZNF211, Zinc finger protein 211.

* $P < .05$, ** $P < .01$ compared to controls.

in the elderly. For this purpose, we carried out a microarray analysis to analyze transcriptomic differences in white blood cells. During the acute and subacute phases, it is known that patients who have suffered an ICH present an alteration in blood inflammatory molecules.^{9,13} To avoid that in our study, we planned our experiments to determine changes in gene expression during a chronic phase of the disease. Using this methodology, we identified several transcripts specific to each etiology in a small number of samples. We were not, however, able to replicate these results in measurements of the expression levels of the selected genes using qRT-PCR in a larger cohort. The small sample size may have affected our results, although we cannot rule out that the gene expression profile of white blood cells is not altered by different ICH origins. Despite this, we found increased levels of GOLGA8A (transcript and protein) in ICH patients, which were associated with the total number of ICHs, independent of the etiology. GOLGA8A function is not well described but is thought to be involved in the maintenance of the Golgi apparatus structure.²³ It has been suggested that fragmentation of the Golgi apparatus after cell death leads to the conversion of this protein into immunostimulant fragments.²⁴ To the best of our knowledge, GOLGA8A has not been associated with either stroke or any other neurological disease. Although circulating GOLGA8A levels were related to the presence of multiple ICHs in our cohort, the biomarker presented a trend that predicted new hemorrhagic events in CAA-ICH cases. We cannot reckon, however, that it can be an indicator of a repair process occurring during the chronic phase following severe brain damage.

A clear limitation of our study is the small included cohort. Thus, despite the consistency of the transcript and protein determinations across different cohorts, our clinical findings need to be confirmed in a new and larger population.

Conclusions

In summary, this is the first global expression analysis study to differentiate the ICH etiology using microarray technology. This work reveals the difficulties inherent to the discovery of new molecules related to CAA or to HTN-related specific inflammatory changes after an ICH using a massive screening technique. Nevertheless, we found that plasma GOLGA8A levels are associated with ICH occurrence and correlate with the number of total ICHs, but may not be a useful biomarker for the diagnosis of this stroke subtype. The implication of GOLGA8A in this fatal disorder needs to be further studied.

Appendix: Supplementary Material

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.11.032](https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.11.032).

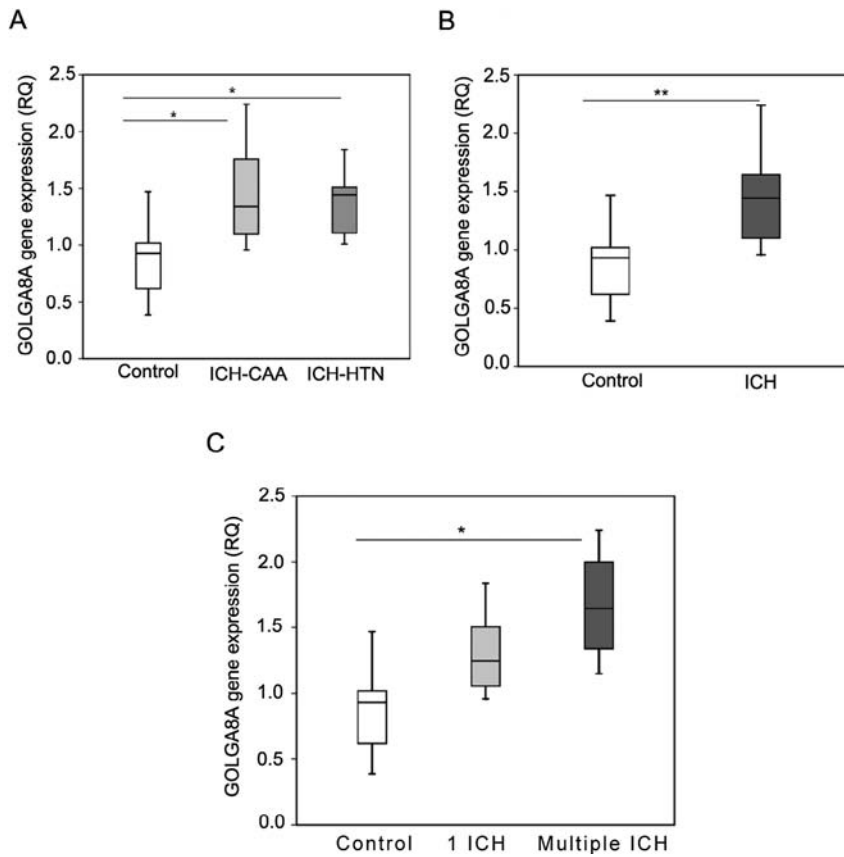


Figure 2. GOLGA8A gene expression in ICH patients and controls. (A) Comparison between different ICH etiologies ($n = 6$ per group) and (B) independent of the ICH etiology (ICH cases, $n = 12$; controls, $n = 6$). (C) GOLGA8A gene expression level according to the presence of a single ($n = 7$) or multiple ICHs ($n = 5$). * $P < .05$; ** $P < .01$. Abbreviations: CAA, cerebral amyloid angiopathy; GOLGA8A, Golgin A8 Family, Member A; HTN, hypertension; ICH, intracerebral hemorrhage; RQ, relative quantification.

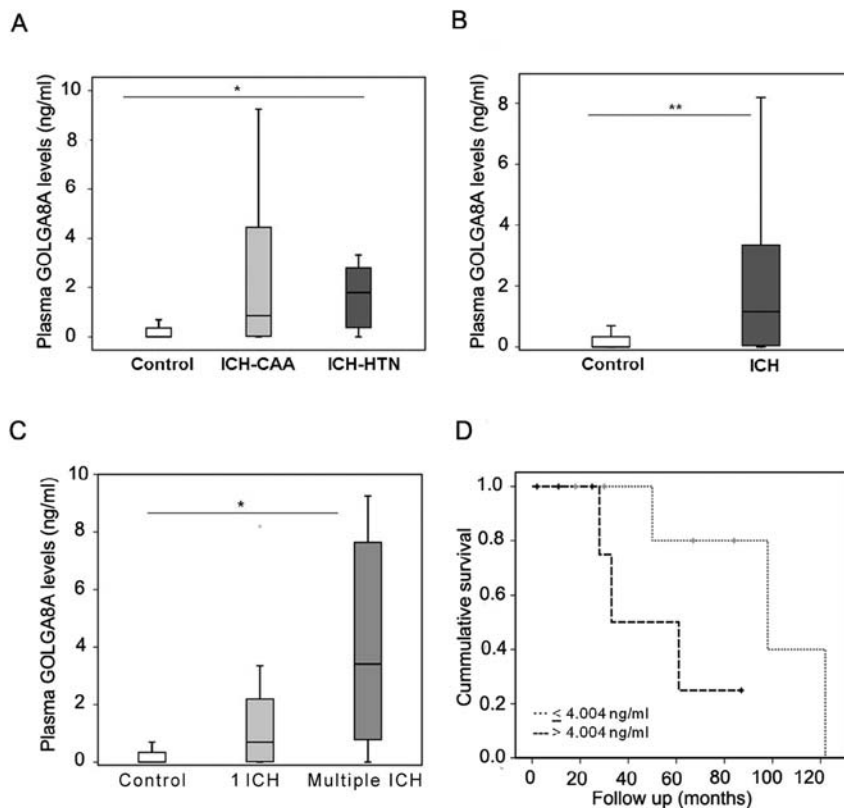


Figure 3. Plasma GOLGA8A levels in ICH patients and controls, (A) considering different ICH etiology (CAA-ICH, $n = 15$; HTN-ICH, $n = 8$; controls $n = 11$) and (B) independent of the ICH etiology (controls, $n = 11$; ICH, $n = 23$). (C) GOLGA8A protein levels according to the presence of a single ($n = 13$) or multiple ICHs ($n = 8$). (D) Kaplan-Meier curve showing the risk of ICH recurrence based on plasma GOLGA8A levels. * $P < .05$; ** $P < .01$ versus controls. Abbreviations: CAA, cerebral amyloid angiopathy; GOLGA8A, Golgin A8 Family, Member A; HTN, hypertension; ICH, intracerebral hemorrhage.

Table 2. Demographic factors, risk factors, clinical variables, and their influence on GOLGA8A level among the studied cohort.

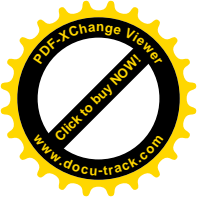
Characteristics and risk factors	Plasma GOLGA8A levels (ng/mL)		
	Yes	No	P
Sex (female)	.935 (.000-4.985)	.285 (.000-1.265)	.254
Diabetes mellitus	.935 (.000-2.223)	.150 (.000-1.885)	.392
Hypertension	.555 (.105-1.755)	.400 (.000-3.320)	.907
	R		
Age	.154		.424
mRS score	.398		.179
Number of ICHs	.435		.018*
Time (from the last bleeding)	-.132		.590
Brain residual volume	.086		.743

Abbreviations: GOLGA8A, Golgin A8 Family, Member A; ICH, intracerebral hemorrhage; mRS, modified Rankin Scale.

* $P < .05$.

References

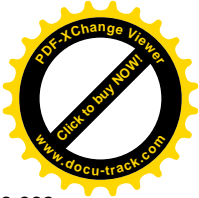
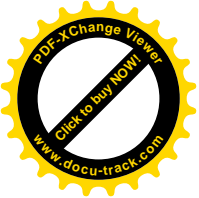
- Morgenstern LB, Hemphill JC 3rd, Anderson C, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2010;41:2108-2129.
- Mohr JP, Caplan LR, Melski JW, et al. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology* 1978;28:754-762.
- Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* 2000;20:8-22.
- Fisher CM. Pathological observations in hypertensive cerebral haemorrhage. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971;30:536-550.
- Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP, et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2001;14:1450-14607.
- Maeda A, Yamada M, Itoh Y, et al. Computer-assisted three-dimensional image analysis of cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 1993;24:1857-1864.
- Zia E, Engström G, Svensson PJ, et al. Three-year survival and stroke recurrence rates in patients with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2009;40:3567-3573.
- Vernooij MW, van der Lugt A, Ikram MA, et al. Prevalence and risk factors of cerebral microbleeds: the Rotterdam Scan Study. *Neurology* 2008;70:1208-1214.
- Wang J, Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:894-908.
- Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, et al. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston criteria. *Neurology* 2001;56:537-539.
- Kothari RU, Brott T, Broderick JP, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 1996;27:1304-1305.
- Gebel JM, Sila CA, Sloan MA, et al. Comparison of the ABC/2 estimation technique to computer-assisted volumetric analysis of intraparenchymal and subdural hematomas complicating the GUSTO-1 trial. *Stroke* 1998;29:1799-1801.
- Brunswick AS, Hwang BY, Appelboom G, et al. Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci* 2012;321:1-10.
- Abilleira S, Montaner J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 2003;99:65-70.
- Acar A, Cevik MU, Arkanoglu A, et al. Serum levels of calcification inhibitors in patients with intracerebral hemorrhage. *Int J Neurosci* 2012;12:227-232.
- Zhang X, Lu XM, Huang LF, et al. Copeptin is associated with one-year mortality and functional outcome in patients with acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Peptides* 2012;33:336-341.
- Dong XQ, Huang M, Hu YY, et al. Time course of plasma leptin concentrations after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *World Neurosurg* 2010;74:286-293.
- Delgado P, Cuadrado E, Rosell A, et al. Fas system activation in perihematomal areas after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2008;39:1730-1734.
- Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Penalba A, et al. Plasma β -amyloid levels in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Neurodegener Dis* 2012;10:320-323.
- Dvorak F, Haberer I, Sitzer M, et al. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009;27:37-41.
- Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, et al. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics* 2012;75:4758-4765.
- Roudbary SA, Saadat F, Forghanparast K, et al. Serum C-reactive protein level as a biomarker for differentiation of ischemic from hemorrhagic stroke. *Acta Med Iran* 2011;49:149-152.
- Stinton LM, Eystathioy T, Selak S, et al. Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. *Clin Immunol* 2004;110:30-44.
- Nozawa K, Casiano CA, Hamel JC, et al. Fragmentation of Golgi complex and Golgi autoantigens during apoptosis and necrosis. *Arthritis Res* 2002;4:R3.



Supplemental Material

Supplemental Table 1. Transcripts differentially expressed with non adjusted p value below 0.01 in each group. Group 1 is defined as transcripts altered in samples from CAA-ICH patients; Group 2, in HTN-ICH patients; and Group 3 combining both subtypes of ICH.

SYMBOLS	Differential	CAA-ICHvsCTL		HTN-ICHvsCTL		HTN-ICHvsCAA-ICH	
	Group	LogFC	P-Value	LogFC	P-Value	LogFC	P-Value
NEDD8	1	-0.692	0.001	--	--	0.578	0.010
GCHFR	1	-0.537	0.001	--	--	0.606	0.002
ZNF211	1	-0.596	0.000	--	--	0.505	0.004
GPR52	1	0.367	0.009	--	--	-0.475	0.004
MSRA	1	0.717	0.001	--	--	-0.686	0.002
NIACR1 /// GPR109B /// GPR109A	1	0.535	0.003	--	--	-0.559	0.006
PRAMEF1 /// PRAMEF2 ///	2	--	--	-0.764	0.001	-0.463	0.009
PRAMEF13							
FAM167B	2	--	--	-0.576	0.007	-0.614	0.002
GPR157 /// MIR34A	2	--	--	-0.488	0.004	-0.452	0.003
NR0B2	2	--	--	-0.449	0.008	-0.557	0.001
USF1	2	--	--	-0.579	0.001	-0.484	0.001
C2orf54	2	--	--	-0.585	0.007	-0.522	0.006
P2RY1	2	--	--	-0.455	0.006	-0.447	0.003
RTP2	2	--	--	-0.505	0.005	-0.458	0.004
NAT8L	2	--	--	-0.467	0.004	-0.444	0.002
TIGD6 /// LOC728287	2	--	--	-0.579	0.009	-0.508	0.009
NUDT13	2	--	--	-0.753	0.009	-0.736	0.005
OR51Q1	2	--	--	-0.673	0.002	-0.559	0.004
ASCL1	2	--	--	-0.858	0.001	-0.524	0.009
CALR3 /// MED26	2	--	--	-0.428	0.007	-0.360	0.009
C22orf37	2	--	--	-0.395	0.004	-0.480	0.000
CCRL2	2	--	--	-1.060	0.006	-1.140	0.002
WNT7B	2	--	--	-0.825	0.001	-0.622	0.004
ADAMTSL4	2	--	--	0.817	0.003	0.651	0.005
ZNF789	2	--	--	1.285	0.002	0.979	0.005
LOC100128868	2	--	--	2.417	0.000	1.532	0.003
GDAP1	2	--	--	0.801	0.007	0.665	0.010
ZNF828	2	--	--	0.525	0.005	0.443	0.007
ZBTB25	2	--	--	1.111	0.008	1.296	0.001



SNRPN	2	--	--	1.048	0.002	0.883	0.002
GOLGA8A /// GOLGA8B ///	2	--	--	3.306	0.000	2.080	0.001
GOLGA8A							
LUC7L	2	--	--	0.697	0.004	0.549	0.008
ADARB1	2	--	--	0.394	0.009	0.386	0.005
B3GALT1	3	-0.529	0.007	-0.723	0.005	--	--
BTNL2	3	-0.418	0.004	-0.476	0.008	--	--
C21orf121	3	-0.346	0.004	-0.534	0.001	--	--
C5orf55	3	-0.527	0.009	-0.704	0.007	--	--
CAV1	3	-0.355	0.004	-0.453	0.005	--	--
CEND1	3	-0.401	0.002	-0.431	0.008	--	--
CNN2	3	-0.896	0.001	-0.946	0.002	--	--
DEFA5 /// LOC441268	3	-0.569	0.002	-0.582	0.009	--	--
EYA3	3	0.881	0.000	0.806	0.001	--	--
FAM151B	3	0.446	0.006	0.551	0.007	--	--
FN3K	3	-1.122	0.003	-1.290	0.006	--	--
hCG_2039146 /// SHISA7	3	-0.411	0.005	-0.508	0.007	--	--
IP6K1	3	-0.885	0.002	-0.959	0.007	--	--
KIAA1432	3	0.493	0.008	0.707	0.004	--	--
NPCDR1	3	0.355	0.003	0.491	0.002	--	--
OCR1	3	2.409	0.006	2.964	0.007	--	--
RAB3IP	3	-0.582	0.001	-0.503	0.009	--	--
RPL32P3 /// SNORA7B /// SNORA7A	3	0.631	0.002	0.678	0.005	--	--
SLC30A7	3	0.482	0.006	0.723	0.002	--	--
SOX7 /// PINX1	3	-0.427	0.000	-0.453	0.002	--	--
STX16 /// NPEPL1	3	0.543	0.002	0.606	0.005	--	--
SUMO2 /// LOC728825	3	2.010	0.001	2.977	0.000	--	--
TBXA2R	3	-0.589	0.004	-0.673	0.009	--	--
TM9SF1	3	-0.455	0.005	-0.674	0.002	--	--
TMEM14E	3	1.639	0.004	3.129	0.000	--	--
TMEM168	3	0.917	0.004	1.139	0.006	--	--
ZCCHC6	3	0.739	0.006	0.888	0.009	--	--
ZNF117 /// ERV3	3	1.103	0.007	1.469	0.006	--	--
ZNF180	3	0.941	0.001	0.903	0.004	--	--
ZNF285A /// ZNF285 /// ZFP112	3	0.513	0.006	0.779	0.002	--	--
ZNF432 /// ZNF350	3	0.972	0.000	0.839	0.000	--	--

ARTÍCULO 2**NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic stroke.**

Stroke. 2015;46(2):477-84.

NURR1 Involvement in Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment Complications After Ischemic Stroke

Cristina Merino-Zamorano, Mar Hernández-Guillamon, Amandine Jullienne, Audrey Le Béhot, Isabelle Bardou, Mireia Parés, Israel Fernández-Cadenas, Dolors Giralt, Caty Carrera, Marc Ribó, Denis Vivien, Carine Ali, Anna Rosell and Joan Montaner

Stroke. 2015;46:477-484; originally published online December 11, 2014;
doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006826
Stroke is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2014 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0039-2499. Online ISSN: 1524-4628

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/46/2/477>

Data Supplement (unedited) at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/suppl/2015/01/30/STROKEAHA.114.006826.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Stroke* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Stroke* is online at:
<http://stroke.ahajournals.org/subscriptions/>

NURR1 Involvement in Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment Complications After Ischemic Stroke

Cristina Merino-Zamorano, MSc*; Mar Hernández-Guillamon, PhD*; Amandine Jullienne, PhD; Audrey Le Béhot, PhD; Isabelle Bardou, PhD; Mireia Parés, MSc; Israel Fernández-Cadenas, PhD; Dolors Giralt, BSc; Caty Carrera, MSc; Marc Ribó, MD, PhD; Denis Vivien, PhD; Carine Ali, PhD; Anna Rosell, PhD; Joan Montaner, MD, PhD

Background and Purpose—Despite the effectiveness of recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA) during the acute phase of ischemic stroke, the therapy remains limited by a narrow time window and the occurrence of occasional vascular side effects, particularly symptomatic hemorrhages. Our aim was to investigate the mechanisms underlying the endothelial damage resulting from r-tPA treatment in ischemic-like conditions.

Methods—Microarray analyses were performed on cerebral endothelial cells submitted to r-tPA treatment during oxygen and glucose deprivation to identify novel biomarker candidates. Validation was then performed *in vivo* in a mouse model of thromboembolic stroke and culminated in an analysis in a clinical cohort of patients with ischemic stroke treated with thrombolysis.

Results—The transcription factor NURR1 (NR4A2) was identified as a downstream target induced by r-tPA during oxygen and glucose deprivation. Silencing NURR1 expression reversed the endothelial-toxicity induced by the combined stimuli, a protective effect attributable to reduced levels of proinflammatory mediators, such as nuclear factor-kappa-beta 2 (NF- κ -B2), interleukin 1 alpha (IL1 α), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), SMAD family member 3 (SMAD3), colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage; CSF2). The detrimental effect of delayed thrombolysis, in conditions in which NURR1 gene expression was enhanced, was confirmed in the preclinical stroke model. Finally, we determined that patients with stroke who had a symptomatic hemorrhagic transformation after r-tPA treatment exhibited higher baseline serum NURR1 levels than did patients with an asymptomatic or absence of cerebral bleedings.

Conclusions—Our results suggest that NURR1 upregulation by r-tPA during ischemic stroke is associated with endothelial dysfunction and inflammation and the enhancement of hemorrhagic complications associated to thrombolysis. (*Stroke*. 2015;46:477-484. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006826.)

Key Words: hemorrhagic transformation ■ NURR1 ■ stroke ■ tissue-type plasminogen activator

Ischemic stroke is a leading cause of death and permanent disability in adults worldwide. Nevertheless, recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA; Actilyse) is the only acute treatment currently available. When efficient in dissolving blood clots, r-tPA improves clinical outcomes in patients with ischemic stroke.¹ Unfortunately, it is administered to <5% of affected patients, partly because of its narrow therapeutic time-window after symptom onset² and the incidence of intracranial hemorrhage after thrombolysis.³ This fits with the noxious actions of r-tPA on the vascular/cerebral interface, which increase endothelial permeability, alter blood-brain barrier, and favor brain edema.⁴ If thrombolytic complications could be predicted, the number

of patients who benefit from thrombolysis could be significantly increased.

To study the mechanisms underlying the endothelial damage resulting from r-tPA treatment, we performed microarray analyses using cultured human cerebral endothelial cells submitted to r-tPA treatment during oxygen and glucose deprivation (OGD). The nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NURR1; NR4A2) was selected from the validated genes as a candidate molecule potentially altered by r-tPA during ischemia. NURR1 is a nuclear hormone receptor, member of the orphan nuclear receptors, highly expressed in T-cells⁵ and brain tissue,⁶ mainly present in glial cells,⁷ neurons,⁸ and endothelial cells.⁹ In the central nervous system, NURR1 plays an important role in the

Received July 21, 2014; final revision received October 17, 2014; accepted November 12, 2014.

From the Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain (C.M.-Z., M.H.-G., M.P., I.F.-C., D.G., C.C., A.R., J.M.); INSERM UMR-S U919, GIP Cycecon, University of Caen, Caen, France (A.J., A.L.B., I.B., D.V., C.A.); and Neurovascular Unit, Department of Neurology, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain (M.R., J.M.).

*C. Merino-Zamorano and Dr Hernández-Guillamon contributed equally.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://stroke.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/STROKEAHA.114.006826/-/DC1>.

Correspondence to Mar Hernández Guillamon, PhD, Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Pg. Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail mar.hernandez.guillamon@vhir.org

© 2014 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006826

transcriptional activation of tyrosine hydroxylase,¹⁰ which is essential for dopaminergic neuronal development.⁸ However, little is known about *NURR1* involvement in ischemic stroke; it has been reported that *NURR1* mRNA is upregulated in neurons after global cerebral ischemia in gerbils¹¹ and permanent focal middle cerebral artery occlusion in rats,¹² whereas *NURR1* protein has been found to be downregulated in the basal ganglia after transient middle cerebral artery occlusion in mice.¹³

Materials and Methods

Cell Cultures

The cerebral human microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3) was provided by Dr Couraud, Cochin Institute, France.¹⁴ Cells were placed in wells precoated with rat collagen I (1:50) (Cultrex; Gaithersburg, MD), grown in Endothelial Basal Medium (Lonza, Barcelona, Spain) supplemented with 1:2 of the provided factors; human fibroblast growth factor basic (hFGF-B), vascular endothelial growth factor (VEGF), human epidermal growth factor (hEGF), recombinant analog of insulin-like growth factor (R3-IGF-1), hydrocortisone, heparin, ascorbic acid, and 2% fetal bovine serum and maintained at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂ and atmospheric oxygen.

OGD and Cell Treatments

Eighty per cent confluent cultures were exposed to OGD by placing them in an anaerobic chamber (Invivo2, Ruskinn, Pencoed, UK) containing 0.5% O₂, 4.5% CO₂, and 95% N₂ at 37°C for 6 hours with deoxygenated glucose-free RPMI (Gibco, Madrid, Spain). Normoxic cultures (control condition) were maintained at 37°C in the incubator containing 5% CO₂ and atmospheric oxygen with RPMI with glucose (2 g/L) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Cultures were treated with 13 µg/mL (estimated concentration of r-tPA in plasma of patients with ischemic stroke receiving intravenous thrombolytic therapy) or 100 µg/mL of r-tPA (Actilyse, Boehringer, Ingelhem, Germany) or distilled water as vehicle. Cell viability was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction and cytotoxicity by lactate dehydrogenase (LDH) release (methods I in the online-only Data Supplement).

Microarray Gene Expression Analyses

A microarray study was performed to identify differentially expressed genes using an adjusted $P < 0.05$ as a cutoff for the effect of r-tPA during OGD compared with control conditions. Gene expression profiles were obtained using GeneChip Human Genome U133 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). Complete information is described in methods II in the online-only Data Supplement. A validation study to confirm the expression of the selected genes was performed by quantitative real-time polymerase chain reaction using new cultures. Complete information is described in methods III in the online-only Data Supplement.

Western Blot

Western blotting was performed as described in methods IV in the online-only Data Supplement. The antibodies used were anti-*NURR1* (1:1500, Sigma-Aldrich) or anti-β actin (1:10000; Sigma-Aldrich).

Gene Silencing

NURR1 gene silencing was performed with passive small interfering RNA (siRNA) delivery via Accell SMART pool siRNA (Thermo Scientific, Rockford, IL) following the manufacturer's protocol. Cells were plated at 80 000 cells/mL and treated separately with the respective siRNA solutions (1 µmol/L). Nontargeting siRNA was used to measure the side effects of the assay. Cyclophilin B siRNA was used to test the efficiency and specificity of *NURR1* silencing. Cells were preincubated for 48 hours in siRNA-containing Accell media, before being replaced with RPMI for the corresponding treatments.

TaqMan Array Human Immune Panel

cDNAs from 4 independent cultures subjected to *NURR1* gene silencing or noncoding siRNA were mixed with equal volumes of TaqMan 2XPCR master mix (Applied Biosystems, UK), and 400 ng of cDNA were loaded into each port of the TaqMan Human Immune panel (Applied Biosystems). The plates were run in a 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Relative gene expression values were obtained as described in methods III in the online-only Data Supplement using the cells treated with noncoding siRNA in control conditions as the calibrator for each experiment.

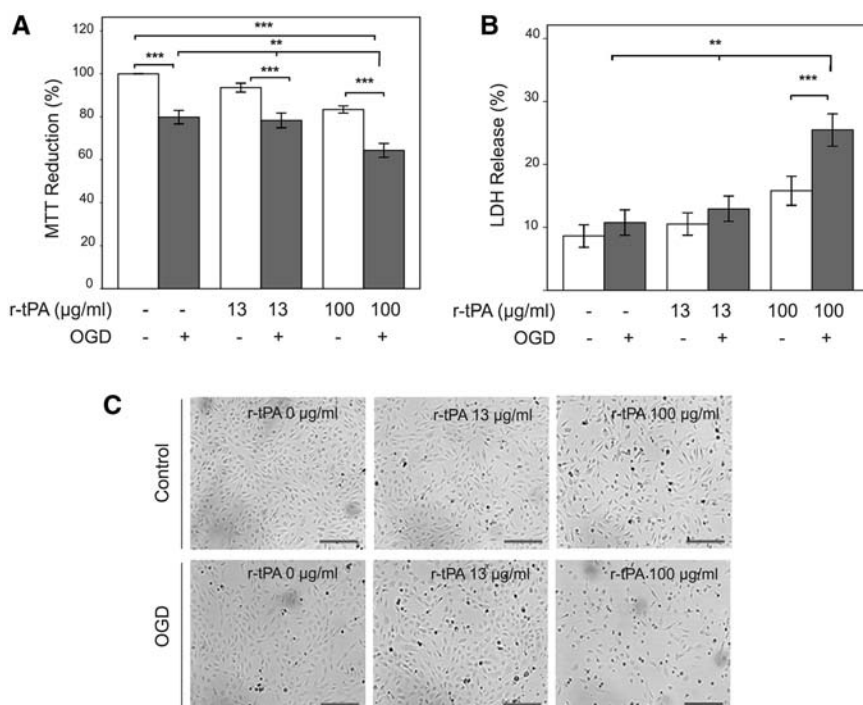


Figure 1. Effect of recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA) treatment under oxygen and glucose deprivation (OGD). **(A)** Cell viability and **(B)** toxicity in hCMEC/D3 exposed to 6-hour r-tPA treatment during OGD. **(C)** Representative images of cells after treatments. Bars, 200 µm. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$.

Thromboembolic Stroke Model

This model of thrombus formation in the middle cerebral artery is based on the activation of the coagulation cascade induced by thrombin injection.¹⁵ r-tPA-induced thrombolysis (10 mg/kg; Actilyse; tail vein injection, 10% bolus, 90% perfusion during 40 minutes) was initiated either 20 minutes or 4 hours after the induction of stroke. The lesion volumes were quantified 24 hours after stroke on MRI as previously described.¹⁶ Complete information is described in methods V in the online-only Data Supplement.

Analyses of NURR1 Expression in the Mouse Brain

NURR1 gene expression was analyzed from the RNA extracted from each brain hemisphere after 24 hours by using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and reverse-transcribed using the iScript Select cDNA Synthesis Kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Relative mRNA transcription was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$

method (methods III in the online-only Data Supplement). Final values are expressed as the ratio of *NURR1* expression in the ipsilateral and contralateral hemispheres in each condition. Five animals per group were used for the gene expression analyses. *NURR1* protein expression was analyzed by Western blot (methods IV in the online-only Data Supplement) or immunohistochemistry (methods VI in the online-only Data Supplement) using anti-NURR1 (mouse 1:1000; Sigma-Aldrich) in 3 animals per group.

Serum From Patients With Ischemic Stroke

Peripheral blood samples were obtained from patients with ischemic stroke at baseline (before r-tPA administration), 1 hour (by the end of r-tPA infusion), 12 and 24 hours after stroke onset. Patients received r-tPA at the standard 0.9 mg/kg dose. A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. Our cohort included 28 stroke r-tPA treated patients and 9 sex- and age-balanced stroke-free controls. Stroke severity was assessed with the National Institute of Health

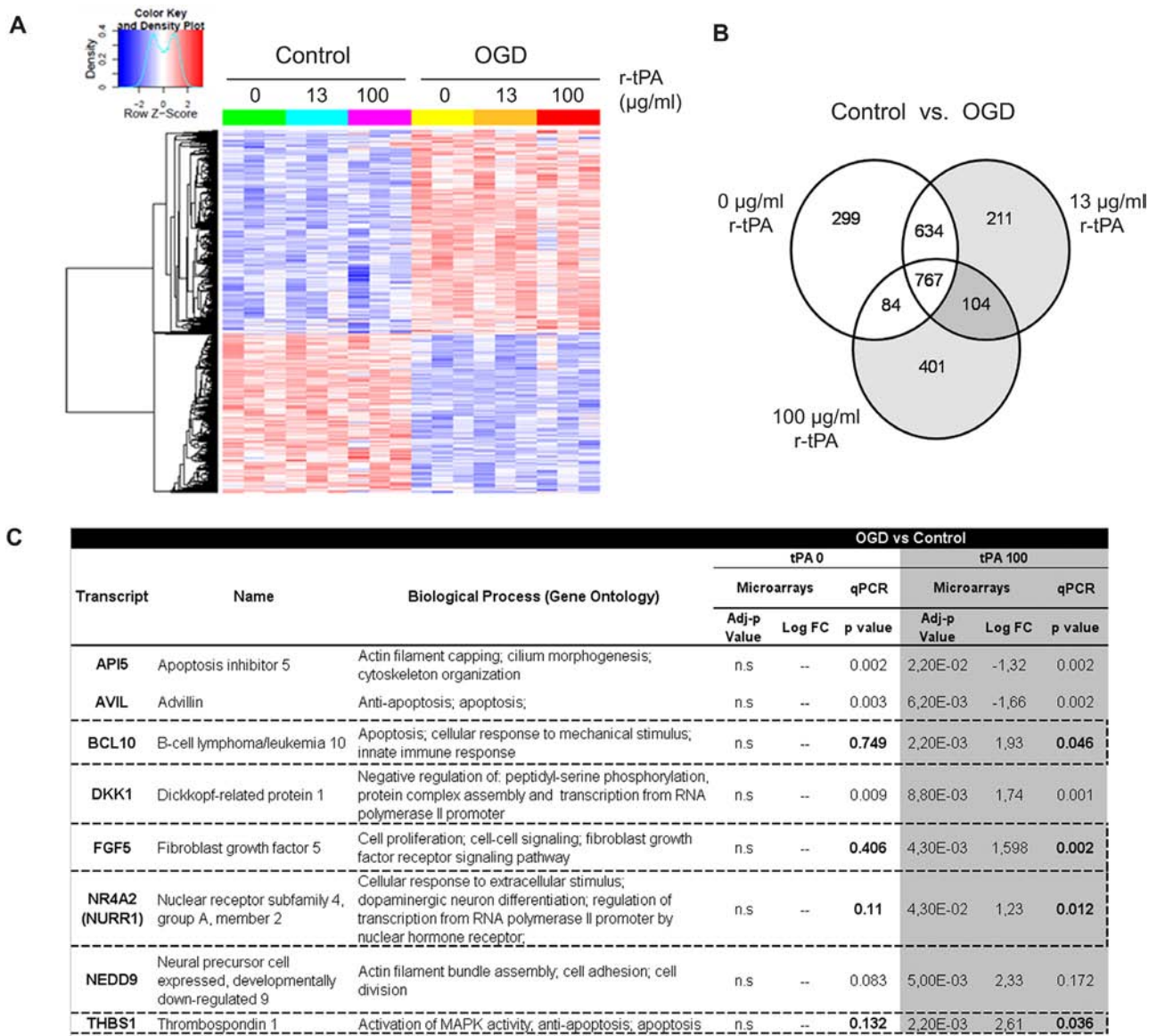


Figure 2. Microarray analyses of hCMC/D3 cells treated with recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA) during oxygen and glucose deprivation (OGD). **(A)** Heat map illustrating differential gene expression profiles. Blue color represents downregulation, red color represents upregulation, and unregulated genes are displayed in white. **(B)** Venn diagram of transcripts significantly regulated. Those influenced by r-tPA are highlighted in gray. **(C)** Data from the validation study performed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Dashed frames indicate the genes validated by qPCR.

Stroke Scale, and neurological improvement was defined as a decrease in National Institute of Health Stroke Scale score of 4 points and deterioration as either death or an increase in National Institute of Health Stroke Scale score by 4 points at 24 or 48 hours after symptom onset. All patients underwent computed tomographic examination within the first 3 hours of stroke onset and repeated between 24 and 48 hours later (or earlier in cases of rapid neurological deterioration) to evaluate the presence of hemorrhagic transformation (HT). Hemorrhagic infarction was defined as a petechial infarction without a space-occupying effect, and parenchymal hemorrhage was defined as hemorrhage with a mass effect.¹⁷ Symptomatic intracranial hemorrhage was defined as blood at any site in the brain on the computed tomographic scan and documentation of neurological deterioration. The cohort was selected consecutively from our biobank according to the presence or absence of HT after receiving r-tPA. Fifty per cent of the patients had experienced any type of HT, and among them, 6 had experienced symptomatic HT.

Serum samples were processed by centrifugation at 3500 rpm for 15 minutes (4°C) and stored at -80°C until use. The study was approved by the Ethics Committee of Vall d’Hebron Hospital, and all patients or their relatives provided written informed consent.

NURR1 ELISA

An ELISA kit from Cusabio Biotech (Wuhan, China) was used for quantitative determination of NURR1 concentration according to the manufacturer’s instructions. Fifty microliter of human serum samples was analyzed in duplicate.

Statistical Analyses

Statistical differences were assessed with Mann–Whitney *U* and Kruskal–Wallis or one-way ANOVAs with Bonferroni post hoc

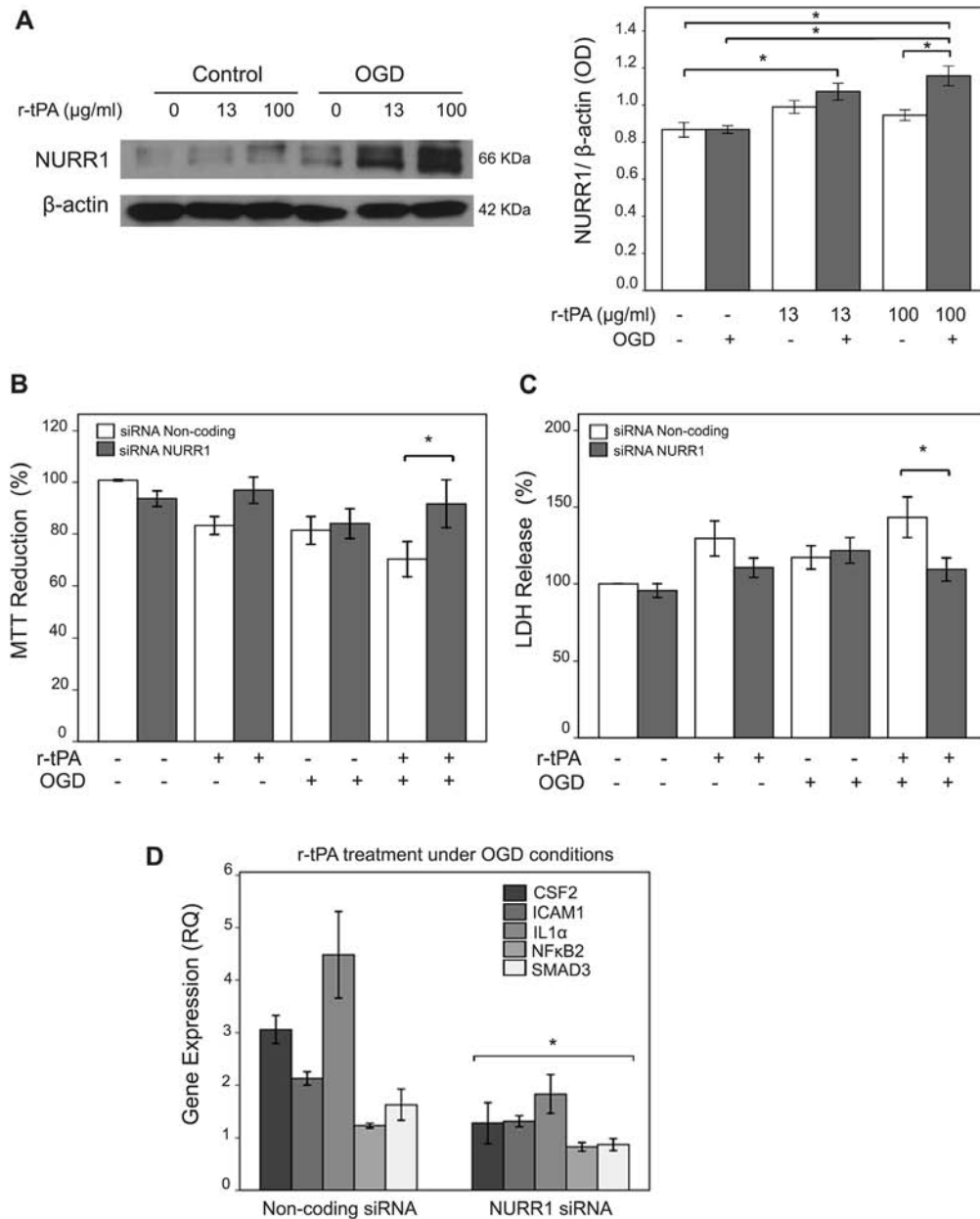


Figure 3. NURR1 expression in hCMEC/D3 cells. **(A)** Western blot of NURR1 expression after 100 µg/mL recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA) treatment during oxygen and glucose deprivation (OGD). **(B)** Impact on cell viability and **(C)** cytotoxicity of 100 µg/mL r-tPA during OGD in *NURR1* small interfering RNA (siRNA)-silenced cells or noncoding siRNA (NC) cells, compared with control conditions. **(D)** Immune array analysis after *NURR1* silencing: Representation of the transcripts overexpressed in OGD+r-tPA condition and regulated by *NURR1* silencing. **P*<0.05.

test, as appropriate, using the SPSS 15.0. Variables from the experimental models are presented as mean±SEM. Data from human samples (normally distributed) are presented as mean±SD. Receiver operating characteristic curves were used to calculate the sensitivity and specificity with which NURR1 levels could predict symptomatic HT. $P < 0.05$ was considered statistically significant at a 95% confidence level.

Results

Toxic Effect of r-tPA on Brain Endothelial Cells Under Ischemia-Like Conditions

A 6-hour treatment with 13 µg/mL r-tPA was not toxic to cultured cerebral endothelial cells, whereas 100 µg/mL r-tPA induced a significant reduction in cell viability and metabolism (16.6±2.13%), as shown by MTT reduction. LDH release showed a nonsignificant change in cytotoxicity by r-tPA. OGD triggered a higher reduction in cell viability (19.4±12%), and the combination of OGD and r-tPA treatment produced an additive decrease in an r-tPA dose-dependent manner (22.6±14 and 35.6±13.3 in r-tPA 13 and 100 µg/mL treatments, respectively). However, results from LDH release indicated a cell death threshold, only exceeded when OGD was combined with 100 µg/mL r-tPA (25.5±7.7% cell death; Figure 1A–1C).

Gene Expression Profiles Induced by r-tPA Under OGD in Brain Endothelial Cells

A microarray study was performed to conduct a genome-wide comparison of brain endothelial cells treated with either a 13 or 100 µg/mL concentration of r-tPA under OGD. A total of 2500 analysed transcripts (Adj- $P < 0.05$) were differentially regulated by 6 hours OGD (Figure 2A and 2B). We focused on the identification of genes exclusively altered by r-tPA during OGD, and the final list of candidates is presented in Figure 2C. When the expression of those genes was assayed

by quantitative real-time polymerase chain reaction, the overexpressed patterns identified for *BCL10*, *NURR1*, *FGF5*, and *THBS1* were validated, whereas the gene expression differences found for *DKK1* and *NEDD9* were not corroborated. Regarding those genes downregulated after treatments, results from *AVIL* and *API5* expression were also not validated because OGD induced a downregulation in both r-tPA-treated and nontreated cells (Figure 2C).

NURR1 Expression in Cultured Brain Endothelial Cells

NURR1 was selected as an interesting candidate gene related to the adverse effects of r-tPA treatment. We confirmed its protein overexpression after 13 µg/mL, and especially at 100 µg/mL r-tPA treatment, only under OGD (Figure 3A). Gene silencing experiments were designed to test the effect of NURR1 upregulation on the cytotoxicity induced by high doses of r-tPA in OGD-treated hCMEC/D3 cells. *NURR1* siRNA specifically depleted the mRNA levels and downregulated the protein expression (Figure 1 in the online-only Data Supplement). *NURR1* knockdown protected cells from the cytotoxicity observed after 100 µg/mL r-tPA treatment during 6 hours OGD compared with the cells transfected with a nontargeting siRNA control (Figure 3B and 3C). A human immune array was conducted to evaluate the gene expression changes related to inflammation and apoptosis because of *NURR1* silencing. *NURR1* knockdown resulted in the downregulation of 4 targets exclusively after 100 µg/mL r-tPA treatment during OGD (*CSF2*, *IL1α*, *NFKB2*, and signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*); Table I in the online-only Data Supplement). Additionally, *NURR1* downregulation prevented the overexpression of *CSF2*, *IL1α*, *NF-κ-B2*, *ICAM1*, and *SMAD3* induced by the combination of r-tPA and OGD (Figure 3D).

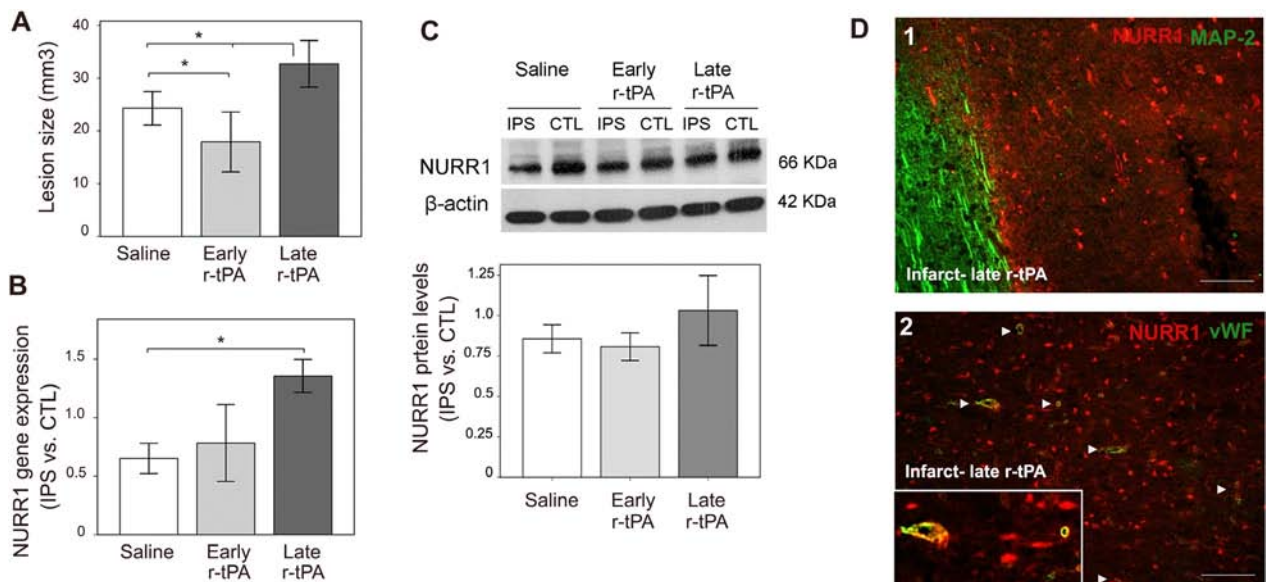


Figure 4. NURR1 brain expression in mice thromboembolic stroke. (A) Ischemic lesion volumes after thrombolysis with recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA) at 20 minutes and 4 hours measured by MRI after 24 hours of stroke initiation. (B) *NURR1* brain expression determined by quantitative real-time polymerase chain reaction in mice treated with saline or r-tPA. Results are expressed as the ratio between the values obtained in the ipsilateral and contralateral hemispheres. * $P < 0.05$. (C) Western blot of NURR1 expression in the ipsilateral (IPS) and contralateral (CTL) hemispheres of mice treated with saline or r-tPA after cerebral ischemia. (D) NURR1 (in red) and microtubule-associated protein 2 (MAP-2) or von Willebrand factor (vWF) (in green) coimmunoreactivity in the infarct area in animals treated with late r-tPA. Bars, 50 µm.

NURR1 Expression in Mice Thromboembolic Stroke

We used a mouse model of thromboembolic stroke induced by a local injection of thrombin in the middle cerebral artery. Consistent with clinical observations, ischemic lesion volumes after 24 hours were reduced by $26.26 \pm 7.39\%$ when thrombolysis was performed 20 minutes after stroke onset, while these volumes were increased by $34.59 \pm 5.77\%$ when r-tPA was administered 4 hours after the initiation of stroke (Figure 4A). *NURR1* gene expression in the ipsilateral hemisphere was enhanced after delayed r-tPA administration compared with saline-treated mice (Figure 4B). At the protein level, most likely because of the extensive cell death after 24 hours of ischemia, we observed higher NURR1 expression in the contralateral than in the ipsilateral hemisphere in saline or early r-tPA treated mice. However, NURR1 expression in the ipsilateral was also enhanced after delayed r-tPA administration (Figure 4C), although the differences did not reach statistical significance. NURR1 expression was confirmed in the ipsilateral area of late-thrombolysed mice (Figure 4D1). In addition, brain vessels in that area were immunolabeled with NURR1 as evidenced by the colabeling with von Willebrand factor (Figure 4D2).

Soluble NURR1 Levels in Patients With Ischemic Stroke

Serum NURR1 protein levels were analyzed in controls and patients with ischemic stroke who received thrombolysis, selected according to the presence or absence of HT after r-tPA treatment. The time of r-tPA administration after the symptoms onset was not different among patients who presented or not an HT (159 ± 58 minutes, $n=14$ versus 188 ± 47 minutes, $n=14$, $P=0.308$). No statistical differences were found regarding demographic characteristics and main vascular risk factors between controls and patients with ischemic stroke (Table II in the online-only Data Supplement). However, the associations between baseline NURR1 levels and the demographic data and risk factors of the participants are presented in Table. Diabetes mellitus ($P=0.004$) and baseline glucose levels ($P=0.04$) exhibited positive associations with serum baseline NURR1 levels. Regarding clinical complications, the patients who had a parenchymal hemorrhage presented with higher baseline serum NURR1 levels (456.0 ± 136.4 versus 322.1 ± 134.9 pg/mL, $P=0.019$), and those who experienced a symptomatic HT exhibited the highest baseline NURR1 concentrations compared with patients with asymptomatic or absent HT (499.1 ± 129.6 versus 335.2 ± 134.6 pg/mL, $P=0.013$; Figure 5A and 5B). Receiver

Table. Demographic Factors, Vascular Risk Factors, Clinical Variables, and Their Influence on NURR1 Levels Among Patients With Acute Stroke

	Patients With Stroke (n=28)	Serum NURR1 Basal Levels, pg/mL		P Value
		Yes	No	
Sex (female)	14 (50%)	349.5±162.0	391.2±135.2	0.466
Hypertension	15 (53.6%)	399.2±158.8	337.1±132.7	0.276
Dyslipidemia	8 (28.6%)	331.3±128.0	386.0±155.2	0.387
Diabetes mellitus	10 (35.7%)	472.8±129.2	313.5±127.8	0.004
Atrial fibrillation	14 (50%)	313.7±121.0	427.1±154.6	0.040
Hemorrhagic transformation	14 (50%)	421.7±132.4	319.0±132.4	0.065
Parenchymal hemorrhage	10 (35.7%)	456.0±136.4	322.8±134.9	0.019
Symptomatic	6 (21.4%)	499.2±129.6	335.2±134.6	0.013
TOAST				
Cardioembolic	16 (57.1%)	345.4±130.0	429.4±149.2	0.146
Atherothrombotic	9 (32.1%)	377.5±114.1	379.4±157.0	0.980
Ischemic cardiopathy	7 (25%)	359.6±139.5	373.9±153.8	0.829
Antiplatelet medication	14 (50%)	367.2±136.0	373.5±164.2	0.912
Outcome				
Improvement at 24 h	15 (53.6%)	316.8±110.7	425.4±171.1	0.060
Improvement at 48 h	15 (53.6%)	298.8±124.0	456.9±157.5	0.004
Hospital death	9 (32.1%)	440.2±152.8	324.8±129.8	0.050
Rankin third month (mRS >2)	16 (59.3%)	397.8±163.8	313.0±101.9	0.141
Age, y	72.5±9.4	$R=-0.125$		0.525
Leukocytes, U/mm ³	9518.2±2847.5	$R=0.407$		0.060
Platelets, U/mm ³	215450.0±78644.9	$R=0.370$		0.090
Glucose, mg/dL	141.5±49.6	$R=0.405$		0.040
Baseline NIHSS	15.1±6.6	$R=0.292$		0.132

mRS indicates modified Rankin Scale; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; and TOAST classification, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment.

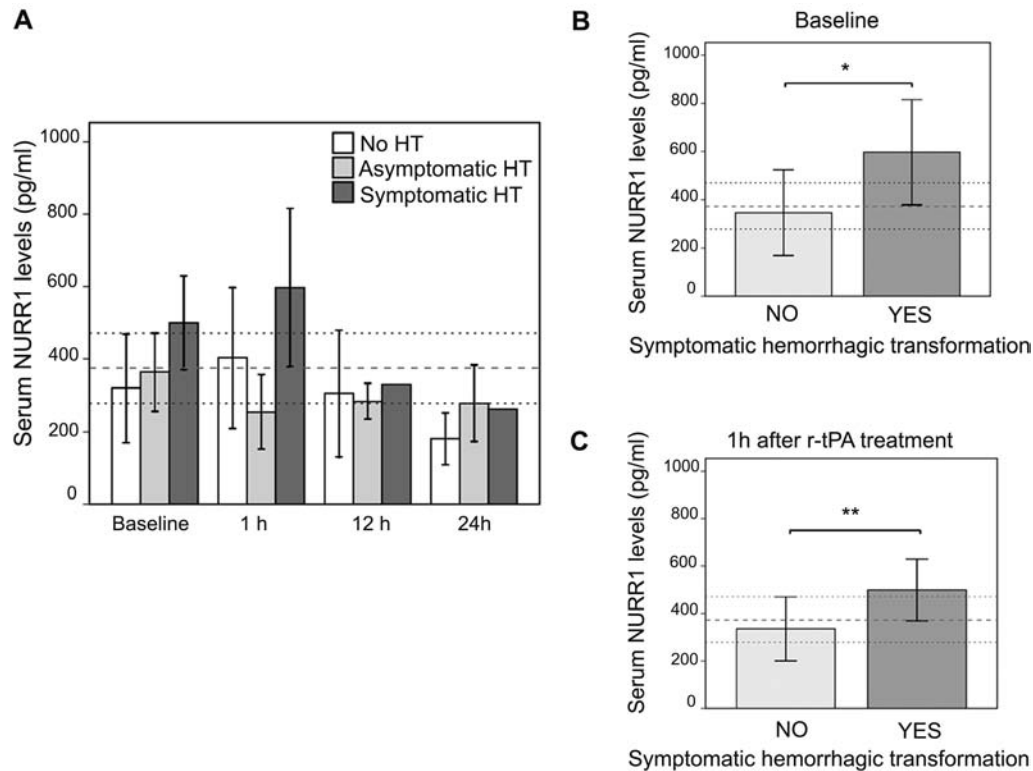


Figure 5. Serum NURR1 levels in patients with stroke. **(A)** Temporal profile of serum NURR1 levels according to the hemorrhagic transformation (HT) type after recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA) treatment. Dashed lines indicate the reference interval of serum NURR1 in controls. **(B)** Serum NURR1 levels at baseline and **(C)** 1 hour after r-tPA treatment segregated by the appearance of symptomatic HT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

operating characteristic curves identified the optimal cutoff for the association of NURR1 levels with symptomatic HT; this cutoff was 442.48 pg/mL ($P = 0.007$), and the sensitivity and specificity were 83.3% and 81.7%, respectively. Baseline NURR1 was the only independent predictor of symptomatic HT in this cohort. Figure 5A displays the temporal profiles of the serum NURR1 levels in the patients with ischemic stroke segregated by HT type after r-tPA administration. Interestingly, serum NURR1 levels increased after 1 hour of r-tPA treatment, especially in those patients who presented a symptomatic HT after the treatment (597.1 ± 218.9 versus 346.5 ± 178.1 pg/mL, $P = 0.008$, Figure 5C). At 12 and 24 hours after the onset of stroke symptoms, serum NURR1 concentration decreased in all groups and was lower than in the controls (Figure 5A).

Discussion

Despite the widely demonstrated efficiency of r-tPA in the treatment of patients during acute ischemic stroke,² it has also been associated with vascular injury, inducing edema formation, and hemorrhagic complications.¹⁸ Symptomatic HT impairs the prognosis and increases the incidence of mortality among patients with stroke who receive r-tPA. Understanding the role of the cerebral endothelium may facilitate the identification of predictive biomarkers of the deleterious effects of the thrombolysis treatment after stroke. Thus, we adopted a translational approach, beginning with a massive screening strategy in cultured human brain endothelial cells subjected to r-tPA treatment during OGD. We selected r-tPA concentrations that

ensured the toxicity on endothelial cells during OGD to simulate the occasional vascular damage induced by thrombolysis in patients with stroke.

The transcription factor NURR1 was selected as a possibly candidate involved in r-tPA activation pathway because of its unidentified involvement in ischemic stroke. NURR1 expression was altered only when cells were challenged to r-tPA during OGD, suggesting its role in ischemia merely when endothelium was severely affected. Across functional studies, we identified NURR1 as a proinflammatory regulator because the silencing of its expression reversed the cell toxicity and the induction of inflammatory molecules, including *NF-κ-B2*, *IL1α*, *ICAM1*, *SMAD3*, and *CSF2*, induced by the combined toxic stimuli.

We confirmed the participation of the endothelium in NURR1 overexpression in mice that had been subjected to thromboembolic stroke, particularly when delayed r-tPA treatment was applied. Based on our observations, it is tempting to speculate that NURR1 inhibition during thrombolysis is a promising approach for avoiding endothelium inflammation during acute stroke. This interpretation may contrast with the role of NURR1 in other systems, which has been reported to act as a crucial molecular check-point for neuronal survival.¹⁹ However, on the other hand, it is known that aberrant NURR1 expression is also a proinflammatory mediator in peripheral diseases, such as rheumatoid arthritis, psoriasis, and multiple sclerosis,^{9,20,21} suggesting its multiple roles in the regulation of specific targets depending on the cell type and the stimulus that induces its activation.²²

We tested the possible clinical implications of our findings by determining the association between NURR1 levels in stroke patient's serum and the posterior complications related to r-tPA therapy. We found that soluble NURR1 concentration before r-tPA administration was associated with the occurrence of symptomatic HT. Furthermore, those levels were higher in patients who had experienced symptomatic HT after receiving r-tPA for 1 hour, which suggests that in vivo overexpression of NURR1 is induced by infused r-tPA. Our results suggest that NURR1 expression levels are associated with the risk of HT. The underlying mechanism could be that as a transcription factor, NURR1 activates the expression of proinflammatory mediators, which would favor leukocyte migration, infiltration, and degranulation, eventually leading to blood-brain barrier disruption and bleeding. This merits future investigations in experimental models.

A limitation of our study using human serum samples is the relatively low number of patients included. Thus, our clinical findings need to be confirmed in a larger cohort; nevertheless, the determination of NURR1 levels in stroke patient serum before r-tPA treatment seems to be a promising strategy for avoiding symptomatic complications and broadening the therapeutic window of thrombolysis.

Summary

Our results suggest that the upregulation of NURR1 by r-tPA during cerebral ischemia is associated with endothelial dysfunction and enhances the adverse effects related to the r-tPA treatment. Additionally, the assessment of serum NURR1 levels at the onset of symptoms might be considered in the clinical management of patients with acute stroke who are eligible for thrombolysis.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Gauberti for performing the model of thromboembolic stroke and corresponding MRI analyses.

Sources of Funding

This work was funded by European Stroke Network (EUSTROKE 7FP Health F2-08-202213), ERANET-NEURON program, INSERM, the French ministry of higher education and research, and the University of Caen Basse-Normandie. The Neurovascular Research Laboratory takes part into the INVICTUS network (RD12/0014/0005). C. Merino-Zamorano is supported by the fellowship FI12/00089 and Drs Hernández-Guillamon, Rosell, and Fernández-Cadenas by the Miguel Servet programme (CP12/03259, CP09/00265, and CP12/03298, respectively) from the Carlos III Institute of Health, Spain.

Disclosures

None.

References

- Broderick JP, Palesch YY, Demchuk AM, Yeatts SD, Khatri P, Hill MD, et al; Interventional Management of Stroke (IMS) III Investigators. Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med*. 2013;368:893–903. doi: 10.1056/NEJMoa1214300.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359:1317–1329. doi: 10.1056/NEJMoa0804656.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, et al; ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators; NINDS rt-PA Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*. 2004;363:768–774. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15692-4.
- Abu Fanne R, Nassar T, Yarovi S, Rayan A, Lamensdorf I, Karakoveski M, et al. Blood-brain barrier permeability and tPA-mediated neurotoxicity. *Neuropharmacology*. 2010;58:972–980. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.12.017.
- Mages HW, Rilke O, Bravo R, Senger G, Kroczeck RA. NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol Endocrinol*. 1994;8:1583–1591. doi: 10.1210/mend.8.11.7877627.
- Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol*. 1992;6:2129–2135. doi: 10.1210/mend.6.12.1491694.
- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*. 2009;137:47–59. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.038.
- Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*. 1997;276:248–250.
- Aherne CM, McMorro J, Kane D, FitzGerald O, Mix KS, Murphy EP. Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Mol Immunol*. 2009;46:3345–3357. doi: 10.1016/j.molimm.2009.07.019.
- Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*. 1999;126:4017–4026.
- Honkaniemi J, Sharp FR. Global ischemia induces immediate-early genes encoding zinc finger transcription factors. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:557–565. doi: 10.1097/00004647-199607000-00005.
- Honkaniemi J, States BA, Weinstein PR, Espinoza J, Sharp FR. Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:636–646. doi: 10.1097/00004647-199706000-00005.
- Erdö F, Trapp T, Mies G, Hossmann KA. Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Acta Neuropathol*. 2004;107:127–136. doi: 10.1007/s00401-003-0789-8.
- Wekslar BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005;19:1872–1874. doi: 10.1096/fj.04-3458fje.
- Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, et al. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke*. 2007;38:2771–2778. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.487520.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke*. 2011;42:2315–2322. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.606293.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995;274:1017–1025.
- Ishrat T, Soliman S, Guan W, Saler M, Fagan SC. Vascular protection to increase the safety of tissue plasminogen activator for stroke. *Curr Pharm Des*. 2012;18:3677–3684.
- Bensinger SJ, Tontonoz P. A Nurr1 pathway for neuroprotection. *Cell*. 2009;137:26–28. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.024.
- O'Kane M, Markham T, McEvoy AN, Fearon U, Veale DJ, FitzGerald O, et al. Increased expression of the orphan nuclear receptor NURR1 in psoriasis and modulation following TNF-alpha inhibition. *J Invest Dermatol*. 2008;128:300–310. doi: 10.1038/sj.jid.5701023.
- Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:8381–8386. doi: 10.1073/pnas.0803454105.
- Johnson MM, Michelhaugh SK, Bouhamdan M, Schmidt CJ, Bannon MJ. The transcription factor NURR1 exerts concentration-dependent effects on target genes mediating distinct biological processes. *Front Neurosci*. 2011;5:135. doi: 10.3389/fnins.2011.00135.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Material and Methods

Supplemental methods I: Cell viability and toxicity assays

Cell viability was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) reduction. After treatments, 0.5 mg/ml MTT was added to cells and kept at 37°C during 90 min. Then, the medium was replaced by dimethyl sulfoxide (DMSO). The amount of formazan blue formed after MTT reduction was quantified spectrophotometrically at 575 nm. Results were expressed as the percentage of viable cells compared to non-treated controls for each experiment. Lactate dehydrogenase (LDH) released from damaged cells was used to determine cell cytotoxicity. LDH activity was analyzed in culture media and culture lysates following the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Spectrophotometric measurements were determined at 490nm. The percentage of LDH release represents the LDH present in the cell supernatants respect to the total cellular LDH after treatments, compared to the values in the non-treated controls for each experiment.

Supplemental methods II: RNA purification and hybridisation for microarray gene expression analyses

RNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen, Austin, TX, USA) and cDNA was synthesized from total RNA. A microarray study was performed to identify differentially expressed genes using an adjusted p -value < 0.05 as a cutoff for the effect of r-tPA in OGD compared to control conditions. Gene expression profiles were obtained using GeneChip® Human Genome U133 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) in Cartridge Format (47,000 transcripts analysis). All samples demonstrated characteristics of high-quality cRNA and were subjected to subsequent analyses. The raw expression values obtained directly from CEL files were preprocessed using the robust multi-array method, which is a three-step process that integrates the background correction, normalisation and summarisation of probe values. The selection of differentially expressed genes was based on a linear model analysis with empirical Bayes moderation of the variance estimates. The p -values were adjusted to obtain strong control over the false discovery rate using the Benjamini and Hochberg method. Standard approaches for quality control were employed (these approaches were based on the original Affymetrix methods and probe-level models), and background correction, normalisation and filtering were performed. All statistical analyses were performed using the free statistical language R and the libraries developed for microarray data analysis by the Bioconductor Project (www.bioconductor.org) of the Statistics and Bioinformatics Unit of the Vall d'Hebron Research Institute.

Supplemental methods III: Validation study

The validation study of the differential expression of the genes selected via microarray analysis was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) using RNA samples from new cultures. RNA concentrations and qualities were measured with NanoChips using the Bioanalyzer 2100 system (Agilent). Corresponding cDNAs were synthesised using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA levels were quantified using TaqMan fluorogenic probes (Applied Biosystems) and analysed using Applied Biosystems SDS 7900 system software. The results were normalised to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (Hs99999905_m1) or peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) (Hs99999904_m1) expression levels. The data are expressed as relative quantifications that were calculated as fold change expression values vs. the average expression of a calibrator sample. The relative quantification values were calculated with the

Livak equation ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). The results are expressed as ratios against the calibrator samples analysed in each experiment.

To identify the genes that were exclusively altered by r-tPA treatment during OGD, candidates were selected via the following criteria: (1) the differences in gene expression between OGD and control conditions occurred only in the r-tPA-treated cells; (2) the Adj-p value was below 0.05; (3) $-1.2 < \text{LogFC} > 1.2$, (4) the differences in gene expression between the OGD and control conditions in the non-r-tPA-treated cells had an Adj-p value greater than 0.8; and (5) TaqMan assay probes for the candidates were commercially available. Based on these criteria, the candidate genes were *Thrombospondin 1 (THBS1)* (Hs00962908_m1), *Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9)* (Hs00610587_m1), *B-cell CLL/lymphoma 10 (BCL10)* (Hs00961847_m1), *Dickkopf 1 homolog (DKK1)* (Hs00183740_m1), *Fibroblast Growth Factor 5 (FGF5)* (Hs00738132_m1), *Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2)* (Hs00428691_m1), *Advillin (AVIL)* (Hs00198114_m1) and *Apoptosis inhibitor 5 (API5)* (Hs03681414_m1).

Supplemental Methods IV: Western-blot

After treatments, 15 μg of cell lysates or mice brain homogenates were separated on 10% acrylamide SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto 0.45- μm polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corp.). Membranes were blocked for 1 h with 10% nonfat milk in PBS containing 0.1% Tween 20 and probed with anti-NURR1 (1:1000, Sigma-Aldrich) or anti- β actin (1:10000; Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. After washes, membranes were immunoreacted with HRP-conjugated anti-mouse IgG (NA931, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ USA, 1:1000) for 1 h at room temperature and developed by Supersignal West Pico kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). The amount of target protein was normalized with a calibrator sample. Images were analyzed using ImageJ software (rsbweb.nih.gov).

Supplemental Methods V: Thromboembolic stroke model

Experiments were performed on adult male Swiss mice (35 ± 2 g; CURB, Caen, France) in accordance with French ethical laws (act no. 87–848; Ministère de l’Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) guidelines for the care and use of laboratory animals, and have been approved by the local ethical committee (authorisation code CENOMEXA 0113-03). All efforts were made to limit animal suffering. None of the experimental procedures induced animal mortality. Experiments were performed following the ARRIVE guidelines, including randomization of treatment as well as analysis blind to the treatment.

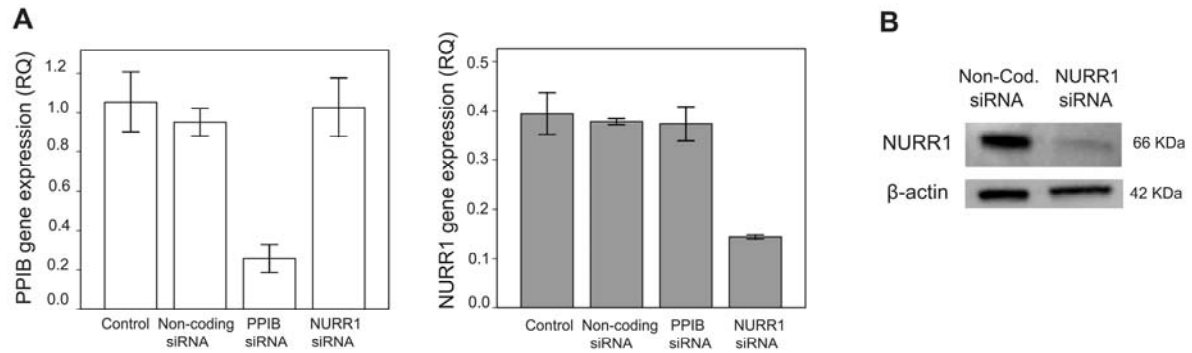
The mice were deeply anesthetised with 5% isoflurane (in a 70%/30% mixture of $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$), placed in a stereotaxic device and maintained under anaesthesia with 2% isoflurane in a 70%/30% mixture of $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$. This model of thrombus formation in the MCA is based on the activation of the coagulation cascade induced by thrombin injection (Orset et al., 2007). Briefly, 1 μL of murine α -thrombin (1 IU; Enzyme Research Labs) was injected into the MCA using a glass micropipette. r-tPA-induced thrombolysis (10 mg/kg; Actilyse®; tail vein injection, 10% bolus, 90% perfusion during 40 min) was initiated either 20 min (early reperfusion) or 4 h (late reperfusion) after the induction of stroke. The controls received saline under identical conditions. Cerebral blood flow in the MCA territory was determined by laser-Doppler flowmetry recording (Oxford Optronix) and was continuously measured before MCAO and throughout the duration of ischemia and thrombolysis. The lesion volumes were quantified 24 h post-stroke on MRI images that were acquired with a Pharmascan 7 T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany). During the MRI experiments, anaesthesia was

maintained using isoflurane (70%/30% mixture of N₂O/O₂). Diffusion-weighted images were acquired using a standard spin echo imaging modified with a Stejskal-Tanner gradient scheme. Parameters were set as follows: TR/TE 2500ms/33ms, matrix size of 256x256 giving an in plane resolution of 78 x 78 μm, slice thickness of 0.5mm, one direction diffusion gradient (in the frequency encoding direction) with a b factor of 1000 s/mm² and two averages. Lesion sizes were quantified on these images using ImageJ (NIH software v1.45r, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Supplemental Methods VI: Immunohistochemistry

Twenty-four hours after stroke, anaesthetised mice were perfused transcardially with cold heparinised NaCl 0.9% followed by 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed, post-fixed overnight at 4°C, rinsed in Coons buffer containing 20% sucrose and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL). Coronal sections of 10 μm thickness were incubated overnight at room temperature with anti-NURR1 (mouse 1:1000; Sigma-Aldrich), anti-vWF (rabbit 1:1000; Dako), or anti-MAP-2 (chicken 1:8000; Abcam). Detection was performed using fluorescein isothiocyanate (FITC) or tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC,)-conjugated donkey anti-IgG secondary antibody (1:300, Jackson Immunoresearch, West Grove, USA). Sections were placed on coverslips and mounted in an antifade medium and were examined with a Leica DM6000 microscope. Images were digitally captured using a Coolsnap camera and visualised with Metavue software. Immunohistochemistry was performed in at least 3 animals per group.

Supplemental Figure I



Supplemental Figure I. NURR1 gene silencing in hCMEC/D3 cells. **A)** qPCR performed after siRNA delivery of Cyclophilin B (PPIB) and NURR1 demonstrating the efficiency and specificity of the silencing approach. NURR1 siRNA specifically depleted the mRNA levels by as much as 64% compared to the non-transfected cells and the non-coding (N.C) siRNA control cells. **B)** NURR1 protein downregulation after siRNA transfection was also confirmed by Western-blot.

Supplemental Table I.

Transcript	Name	NC siRNA Control vs NC siRNA OGD +r-tPA	NC siRNA Control vs NURR1 siRNA Control	NC siRNA OGD + r-tPA vs NURR1 siRNA OGD + r-tPA
BAX	BCL2-associated X protein	p=0.014	p=0.019*	--
C3	Complement component 3	--	p=0.049 ^S	p=0.039 ^S
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5 / RANTES	--	p=0.031 ^S	p=0.04 ^S
COL4A5	Collagen, type IV, α 5	--	p=0.019*	--
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	p=0.037	--	p=0.05 [#]
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	--	p=0.019*	--
CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	--	p=0.016*	--
ECE1	Endothelin converting enzyme 1	--	p=0.004*	--
FN1	Fibronectin 1	p=0.014	p=0.019*	--
HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR α	p=0.026	p=0.009*	--
ICAM1	Intercellular adhesion molecule	p=0.014	p=0.019 ^S	p=0.021 ^S
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase β	--	p=0.019*	--
IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	p=0.014	--	--
IL18	Interleukin 18 (interferon- γ - inducing factor)	p=0.003	p=0.02*	--
IL15	Interleukin 15	--	p=0.019*	--
IL1A	Interleukin 1, α	p=0.014	--	p=0.021 [#]
IL1B	Interleukin 1, β	p=0.014	--	--
IL6	Interleukin 6	p=0.014	--	--
IL7	Interleukin 7	p=0.018	--	--
IL8	Interleukin 8	--	p=0.035*	--
NFKB2	Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	p=0.014	--	p=0.009 [#]
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	p=0.014	p=0.019*	--
SELE	Selectin E	p=0.014	p=0.019*	--
SMAD3	SMAD family member 3	p=0.014	p=0.019 ^S	p=0.021 ^S
SMAD7	SMAD family member 7	p=0.025	--	--
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	--	--	p=0.016 [#]
TGFB	Transforming growth factor, β 1	--	p=0.036*	--
TNF	tumor necrosis factor	p=0.014	--	--
VEGF	Vascular endothelial growth factor A	p=0.014	--	--

Supplemental Table I. Human immune array analysis after NURR1 gene silencing.

Table of genes that were significantly altered in each comparison; siRNA NURR1 and non-coding siRNA (NC) in OGD plus r-tPA treatment or control conditions. Knockdown of NURR1 induced a gene downregulation: (*) only in control conditions, (\$) in both control and OGD conditions, and, (#) only under 100 µg/ml r-tPA treatment during OGD.

Supplemental Table II.

	Controls (n=9)	Stroke patients (n=28)	P
Age	76.0 ± 6.2	72.5 ± 9.4	0.308
Sex (Females)	5 (55.6%)	14 (50%)	1.000
Hypertension	6 (66.7%)	15 (53.6%)	0.702
Diabetes Mellitus	1 (11.1%)	10 (35.7%)	0.229

Supplemental Table II. Demographic characteristics and main vascular risk factors of free-stroke controls and ischemic stroke patients.

ARTÍCULO 3**Modulation of beta-amyloid(1-40) transport by ApoA1 and ApoJ across an in vitro model of the blood-brain barrier**

(Submitted to Journal of Alzheimer's Disease, under review)

Modulation of beta-amyloid(1-40) transport by ApoA1 and ApoJ across an in vitro model of the blood-brain barrier

Cristina Merino-Zamorano¹, Sofía Fernández-de Retana¹, Alex Montañola¹, Aina Batlle¹, Julien Saint-Pol², Caroline Mysiorek², Fabien Gosselet², Joan Montaner^{1,3}, Mar Hernández-Guillamón¹

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

² Univ. Artois, EA2465, Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique, LBHE, Lens, F-62300, France

³ Neurovascular Unit, Neurology Department, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain.

Running Title:

A β -clearance modulation by ApoJ and ApoA1

ABSTRACT

Amyloid-beta (A β) accumulation in Alzheimer's disease (AD) and Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA) is likely caused by the impairment of its brain clearance that partly occurs through the blood-brain barrier (BBB). In this context, an in vitro BBB model is a valuable tool for studying the molecular mechanisms that regulate this process. This study assessed brain A β elimination across the BBB and its modulation by the natural chaperones Apolipoprotein A1 (ApoA1) and Apolipoprotein J/Clusterin (ApoJ). The model was based on primary cerebral endothelial cells that were cultured on Matrigel-coated Transwells and treated with fluorescently labeled-A β (1-40) to track its efflux across the BBB, which corresponds to trafficking from the basolateral (brain) to apical (blood) compartments. We observed that the transport of basolateral A β (1-40) was enhanced when it was complexed to rApoJ, whereas the complex formed with rApoA1 did not influence A β (1-40) efflux. However, the presence of rApoA1 in the apical compartment was able to mobilize A β (1-40) from the basolateral side. We also observed that both rApoA1 and rApoJ moderately crossed the monolayer (from blood to brain) through a mechanism involving the LDL receptor-related protein (LRP) family. In contrast to the increased rApoJ efflux when complexed to A β (1-40), rApoA1 trafficking was restricted when it was bound to the A β peptide. In summary, the present study highlights the role of ApoJ and ApoA1 in the in vitro modulation of A β elimination across the BBB.

KEYWORDS

Blood-brain barrier, endothelial cells, amyloid-beta, Apolipoprotein, ApoA1, ApoJ.

INTRODUCTION

Amyloid-beta (A β) is the main component of the amyloid plaques that are found in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients, and also accumulates in cortical and leptomeningeal vessel walls, which affects small size arteries, arterioles and capillaries, in Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA) [1]. A β , which is composed of 38-43 amino acids, is generated by sequential β -secretase and γ -secretase cleavage from the amyloid precursor protein (APP). For unknown reasons, A β (1-42) peptide is the main component of parenchymal senile plaques in AD, whereas the A β (1-40) peptide mostly accumulates in wall vessels in CAA [2].

Current evidence suggests that brain A β accumulation is due to an elimination deficiency rather than to excessive A β overproduction. Indeed, the overall impairment of A β clearance has been demonstrated in sporadic AD cases [3]. The major pathway that mediates brain A β clearance is the cerebrovascular system, where A β is degraded by cerebrovascular cells along the interstitial fluid drainage pathway and/or eliminated through the blood-brain barrier (BBB) [4,5]. The transport of soluble A β across the BBB mainly

occurs via the Receptor for advanced glycation end products (RAGE) [6,7] and the Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) [6, 8-9]. RAGE is expressed on the apical/luminal side of the endothelial monolayer and is largely involved in the entrance of A β into the brain [6, 10]. In contrast, LRP-1 is expressed on the abluminal/brain side of the capillary endothelium and directly interacts with A β to transport this peptide from the brain to the bloodstream [8, 11]. Furthermore, megalin (LRP2) is an important alternative A β receptor-mediated clearance route at the BBB level [9].

It is well known that Apolipoprotein E (ApoE) influences the development of A β -associated pathologies because numerous studies have confirmed that possession of the *ApoE4* allele is the strongest genetic risk factor for both AD and CAA [12, 13]. It remains unclear how ApoE levels or conformations can actually modulate the binding and transport of different amyloid species. Nevertheless, the evident involvement of ApoE in A β -cerebral amyloidosis suggests that other lipid-carriers could also actively participate in A β brain accumulation and clearance processes. Indeed, other apolipoproteins are related

to AD and CAA. This is the case of Apolipoprotein A1 (ApoA1) and Apolipoprotein J (ApoJ), also known as Clusterin (CLU), which are important components of the lipid metabolism, but they may also act as natural A chaperones. ApoJ is expressed in almost all mammalian tissues and is particularly relevant in neurons and astrocytes [14]. The link between ApoJ and A pathology was highlighted in a genome-wide association study that found a statistical association between a SNP within the CLU gene and the risk of suffering AD [15]. In AD brains, ApoJ/CLU is co-deposited with fibrillar A in cerebrovascular and parenchymal lesions [16]. ApoJ also binds to A in CSF and plasma [17, 18], and increased circulating levels of plasma ApoJ are associated with a higher prevalence of AD [19]. Moreover, in vitro studies have demonstrated that ApoJ inhibits the aggregation of soluble A into fibrils [20]. By other hand, ApoA1 is a major component of high-density lipoproteins (HDLs) and it is responsible for the transport of cholesterol to the liver. ApoA1 also binds to A peptides in plasma [18] and it is associated with A in occasional senile plaques in AD brains [21, 22]. Moreover, in vitro studies have shown the capacity of ApoA1 to bind and

prevent A aggregation and toxicity [23, 24].

Most of the A transport studies across the BBB have assessed the clearance of radiolabeled tracers in vivo [6, 8, 9, 25]. Recently, simpler and faster fluorometric methods have been established to evaluate A exchange in BBB models [11, 26-29]. Because the BBB is a natural route for cerebral A elimination, the aim of this project was to determine the possible enhancement of the A (1-40) clearance by the chaperones ApoA1 and ApoJ in a valuable in vitro mouse model using a fluorometric assay. We also determined the flux modulation of these apolipoproteins across the BBB by the A (1-40) peptide.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

All procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Vall d'Hebron Research Institute (38/13 CEEA) and were conducted in compliance with Spanish legislation and in accordance with the Directives of the European Union. For all experiments, male 3-week-old mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) arrived to the animal facility of our institution 24 hours prior to the procedure.

Endothelial cell culture (BBB model)

The in vitro BBB mouse model is based on the primary endothelial cultures previously described by Coisne et al. 2005 [30]. Briefly, mouse brain capillary endothelial cells (MBC ECs) were isolated from the grey matter of brain cortices from 3-week-old C57BL/6J mice. After tissue homogenization, the vascular fraction was obtained by centrifugation with dextran (MW ~200,000 from Leuconostoc mesenteroides, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). From the resulting suspension, capillaries were separated from large vessels by filtration through a 59- μ m nylon mesh and digested with collagenase/dispase (1 mg/ml) (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) in washing buffer (HBSS 1X (Sigma-Aldrich) supplemented with 10 mM HEPES (Gibco, Madrid, Spain)), with DNase (10 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) and TLC K (0.147 μ g/ml) (Roche Diagnostics). According to Coisne et al. (2005) [30], material was seeded at 51,000 digested capillaries/cm² in Matrigel-coated polycarbonate Transwells with a 3 μ m pore size and 12 mm diameter (Corning NY, USA). The culture media was low glucose DMEM (Gibco), supplemented with 15% bovine serum (Gibco), 2% aminoacids (Sigma-Aldrich), 1% vitamins, 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 1% glutamine (Gibco) and 1 ng/ml of bFGF (Sigma-Aldrich). Cells were kept in a humidified incubator containing 5% CO₂ and atmospheric oxygen. The medium was

replaced every day and MBCECs reached the optimal confluence after 5 days of seeding.

Immunocytochemistry analyses

The distribution of endothelial cells and the tightness of our BBB in the in vitro model were determined using CD-31 (Santa Cruz, USA) and Zonula Occludens protein-1 (ZO-1) (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) immunocytochemistry, respectively. Endothelial cells in the filters were fixed with cold 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature (RT) and washed with PBS. Next, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min and blocked with PBS-T containing 0.5% BSA (blocking buffer) for 30 min. Filters were incubated with rabbit anti-CD31 and ZO-1 (1:50) overnight (ON) at 4°C. The secondary antibody Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) was applied in blocking buffer for 1 h at RT, and cell nuclei were stained with DAPI (Vector Labs, USA).

Permeability and cell viability studies

The passage of fluorescent Lucifer Yellow (LY) (50 μ M) (Sigma-Aldrich) in working solution Ringer Hepes Buffer (RH, pH 7.4, 5 mM HEPES, 6 mM NaHCO₃, 150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂·6 H₂O) containing 0.5% BSA (Sigma-Aldrich) was used to verify the tightness and integrity of the BBB during different treatments with a fluorometer (at 432-538 nm). The volume cleared was plotted vs. time and the slope was estimated

with a linear regression analysis. To analyze the influence of the polycarbonate membrane and collagen coating on molecules trafficking, the amount of passage was calculated in both the presence and in the absence of MBC ECs. The slope of the clearance curve of LY with the transwell alone and transwells with cells is equal to PS_f and PS_t , respectively. The PS_e ($\mu\text{l}/\text{min}$) is the permeability-surface area product. Then, the PS value for the endothelial monolayer (PS_e) was computed as follows: $1/PS_t = (1/PS_f) - (1/PS_e)$

To generate the endothelial permeability coefficient, Pe (cm/min), the PS_e value was divided by the surface area of the transwell (1.12 cm^2). After treatments, Pe under $1 \times 10^{-3} \text{ cm}/\text{min}$ represented an intact BBB and was thus considered [31].

After the experiments, endothelial cell viability was determined using an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) reduction assay. Briefly, $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$ of MTT was added to cells seeded on the Transwells and kept at 37°C for 90 min. Next, the medium was replaced by dimethyl sulfoxide (DMSO). The amount of formazan blue formed after the MTT reduction was quantified spectrophotometrically at 575 nm . The results are represented as a percentage compared to non-treated cells.

Recombinant ApoA1 and ApoJ production and purification

Human embryonic kidney 293 cells (HEK 293T) were used for protein expression after transfection with a pcDNA4.0™ vector containing human APOA1 or CLU cDNA (Abgent, Clairemont, San Diego, USA). Stable transfected clones were selected with Zeocin™ (Life technologies, Spain) and maintained to obtain continuous levels of recombinant protein from stable cells supernatants. The expressed proteins contained a c-Myc tag and a V6-His fusion tag for their purification using a nickel-chelating resin. For large-scale production, continuous cell growth in Corning® HYPERFlask® M Cell Culture Vessels (Corning) was performed. HiScreen Ni FF columns (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) were used in an ÄKTA purifier 100 system (GE Bio-Sciences Corp.) for purification by immobilized metal ion affinity chromatography. After elution from the column, dialysis and lyophilization procedures were performed. The final pellet was dissolved in PBS, and the total protein was calculated using MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Analysis by SDS-PAGE with Coomassie Blue staining (BioRad, Hercules, CA, USA) and Image J software (rsweb.nih.gov) showed that the percentage of pure recombinant ApoA1 (rApoA1) and ApoJ (rApoJ) was 90% and 75%, respectively.

Thioflavin-T Binding Assay

To determine the functionality of the rApoA1 and rApoJ proteins, their ability to prevent the aggregation of A (1-40) and A (1-42) peptide was assessed using the Thioflavin T (ThT) binding methodology [32]. A (1-40) and A (1-42) (Anaspec, Fremont, CA, USA) solutions were prepared from lyophilized powders. Each peptide (0.5 mg) was resuspended in 1% NH₄OH in sterilized distilled water to a final volume of 230 µl (1 mM) and sonicated for 30 s following the manufacturer's instructions to avoid aggregation. Next, 20 µl aliquots of both peptides were stored at -80°C until their use. For the ThT binding assay, 2 µl of A (1-42) or A (1-40) was mixed with 150 µl of each respective apolipoprotein diluted in PBS. Three different concentrations of rApo were tested: 13 µM (A :rApo 1:1), 1.3 µM (A :rApo 1:0.1) and 0.13 µM (A :rApo 1:0.01). Then 5 µl of freshly prepared ThT (Sigma-Aldrich; 0.1 mM) were added and 50 mM Tris buffer (pH 8.5) to a final volume of 200 µl. Fluorescence was recorded after 300 s in a fluorometer (SynergyMx, Biotek) with excitation and emission wavelengths of 435 nm and 490 nm, respectively. All measurements were obtained from 4 independent experiments, and the samples were analyzed in duplicate.

Amyloid-beta 1-40 peptide transcytosis across the in vitro BBB model

For the transport studies, MBC ECs were transferred into new 12-well plates and rinsed twice with the working study

solution. The majority of the experiments were performed to evaluate A (1-40) efflux transport, which consists of the flux from the basolateral (corresponding to the brain side) to the apical (corresponding to the blood side) compartment, using a fluorometric assay with Amyloid-beta(1-40) HiLyte™ Fluor 488-labeled (Anaspec) at 485-528nm. The fluorescently labeled A (1-40) solution was prepared from the lyophilized powder, resuspended in 1% NH₄OH and sonicated for 30 s, as previously described for the non-fluorescently tagged peptides. The efflux kinetics were evaluated by transferring MBC ECs to 12-well plates with 6-120 nM of fluorescent A (1-40) peptide in the basolateral compartment. Incubations for all transport experiments were performed at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ with slight agitation for 3 h.

At the end of the experiment, the cleared volume was calculated by dividing the fluorescent signal of A (1-40) in the acceptor compartment by the initial fluorescent signal added to the donor compartment at time 0 (T₀). The transport through endothelial cells was calculated by dividing the values obtained when cells were present in the Transwells by the transport of the substance across Transwells without cells (expressed as % of A (1-40) transport). To assess the possible binding to plastic or polycarbonate membranes or the non-specific binding to cells, the mass balance (%) was calculated from the

amount of fluorescence level in both compartments after the 3 h experiment divided by the initial fluorescence in the donor compartment. Only experiments with a 120% < mass balance > 80% were considered [10].

To investigate the effect of ApoA1 and ApoJ on A (1-40) clearance (efflux), a concentration of 12 nM of A (1-40) was selected. The effect of human rApoA1 and rApoJ (50 nM and 200 nM) was assessed by adding rApoA1 or rApoJ in the apical compartment (as free protein) and rApoA1 or rApoJ bound to A (1-40) in the basolateral compartment (as complexed form). The A (1-40)-rApoA1 and A (1-40)-rApoJ complexes were generated by incubating 50 nM or 200 nM of apolipoproteins with 12 nM of A (1-40) in PBS at 37°C ON with agitation. Functional receptor studies were carried out through the blockage of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 and 2 (LRP1/LRP2) through incubation with 200 nM of human recombinant receptor associated protein (RAP) (Millipore, Corp., Billerica, MA, USA) in the basolateral compartment of the BBB in vitro model for 1 h at 37°C prior to the A (1-40) treatment. In a subset of experiments, A (1-40) transcytosis was confirmed by evaluating the presence of A (1-40) in the donor or acceptor compartment using an ELISA (Human Amyloid beta 40 ELISA Kit, Novex, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

[H³]Inulin flux across the in vitro BBB model

Radiolabeled [H³]Inulin (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) was used as a control for non-specific receptor transport across the endothelial monolayer using a liquid scintillation counter (Tricarb 2100TR). The efflux of [H³]-methoxy-Inulin (Perkin Elmer) (12-120 nM) added to the basolateral compartment was monitored for 3 h. All calculations were completed as described for the A (1-40) transport.

rApoA1 and rApoJ traffic across the in vitro BBB model

Both the influx and efflux transport of rApoA1 and rApoJ across the endothelial monolayer were evaluated after a 3 h incubation at 37°C. Flux from the apical (corresponding to blood) to basolateral (corresponding to brain) compartment is referred to as influx, whereas transport from the basolateral (brain) to apical (blood) side is referred to as efflux. In both cases, the passage goes from the donor to the acceptor chamber. The influence of 12 nM A (1-40) in the basolateral compartment on rApoA1 and rApoJ (200 nM) traffic was evaluated. Furthermore, to investigate the role of LRP family receptors in the entrance of rApoA1/rApoJ into the brain, 200 nM RAP was added to the apical compartment 1 h prior to treatment with the recombinant proteins. After the 3 h treatment, supernatants of the donor and acceptor

compartments were collected and stored at -20°C until use.

To detect rApoA1 or rApoJ in the acceptor compartment after influx or efflux studies, cell supernatants were immunoprecipitated (IP) and sorted with magnetic Dynabeads® M-280 Sheep Anti-Mouse IgG (Novex) that were previously been incubated with Histidine Tag antibody (1 µl, Novex). Samples from the basolateral compartment (750 µl) and the apical compartment (250 µl) were diluted with PBS containing 0.025% Tween 20 (final volume of 1 ml) and incubated with the magnetic Dynabeads® ON at 4°C with agitation. After 3 washes with PBS, the IP material was resuspended in 20 µl of PBS and subjected to by western-blotting.

Western-blotting

A (1-40)-rApoA1 and A (1-40)-rApoJ complexes were generated to be detected using western-blotting by incubating 0.72 µM of A (1-40) and 11.5 µM of rApoA1 or rApoJ (maintaining the same ratio of 1:16 used in the A (1-40) clearance experiments) ON at 37°C with agitation. Thirty-two microliters of each complex solution were loaded and separated using 12% acrylamide SDS-PAGE under reducing conditions and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Millipore Corp.) for 1 h at 100 V. Membranes were blocked for 1 h with 10% nonfat milk in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS-T) and then probed with a mixture of anti-A monoclonal antibodies 4G8 and 6E10 (each

diluted 1:1000 in PBS-T; Covance, Princeton, NJ) ON at 4°C. The 6E10 clone is reactive to amino acid residues 1-16, whereas the 4G8 antibody recognizes the 17-24 residues of A. After washing with PBS-T, membranes were immunoreacted with HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:1000, NA931, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) for 1 h at RT. Membranes were further developed by enhanced chemiluminescence using Pierce® EC L western-blotting Luminol/Enhancer and Stable Peroxide solutions (ThermoFisher Scientific).

To detect rApoA1 and rApoJ after the transcytosis experiments, 20 µl of supernatant from the donor compartment and 20 µl of immunoprecipitated supernatant from the acceptor compartment were loaded and separated on 10% acrylamide SDS-PAGE under reducing conditions. Likewise, to detect LR P1 and LR P2 in cell lysates, 8-10 µg of total protein was loaded and separated on 10% acrylamide SDS-PAGE under reducing conditions. Then, gels were transferred onto 0.45 µm pore size polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corp., Billerica, MA) for 1 h at 100 V. After blocking, the primary antibodies used were rabbit anti-ApoA1 (1:1000, Abcam), mouse anti-ApoJ (1:5000, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), rabbit anti-LR P1 (1:1000, Abcam), rabbit anti-LR P2 (1:1000, Abcam) and mouse anti-beta actin (1:10,000, Sigma-Aldrich). Membranes were immunoreacted

with HRP-conjugated anti-rabbit (1:1000, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) or anti-mouse IgG (1:1000, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) for 1 h at RT and developed as described above. The amount of target protein able to cross the BBB was quantified by measuring the intensity of the corresponding acceptor compartment band using Image J software. The expression of beta-actin was used as a loading control for the quantification of LRP1 and LRP2 expression in the cell lysates.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

RNA from cells seeded on Transwells was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Austin, TX, USA) following the manufacturer's instructions. RNA concentrations and quality were measured with NanoChips using the Bioanalyzer 2100 system (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Corresponding cDNAs were synthesized using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA levels were quantified using the TaqMan fluorogenic probes (Applied Biosystems) for LRP-1 (Mn_01160430_m1) and LRP-2 (Mm_01328171_m1), and were analysed using the Applied Biosystems SDS 7900 system software. The results were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Mm99999915_g1) expression levels. The relative quantification values were calculated using the Livak equation (2^{-C_t}). The results are expressed as ratios of the

calibrator samples analyzed in each experiment

Statistical Analysis

GraphPad Prism 5 was used for statistical analysis. Statistically significant differences were assessed using a t-tests or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-hoc test as appropriate. The variables are presented as the mean \pm SEM. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Production and characterization of human recombinant ApoA1 and ApoJ

Highly pure recombinant proteins were produced from HEK293T cells. rApoA1 and rApoJ contained a c-Myc tag and a polyhistidine tag at the N-terminus that enabled a single-step purification and conferred a 4.81 kDa and 3.30 kDa increase in their molecular weight, respectively, when compared with the corresponding native apolipoproteins purified from human plasma as confirmed by western-blotting (Fig. 1A-B). Thus, To test functionality of the proteins in vitro, increasing concentrations of rApoA1 or rApoJ were incubated with soluble A (1-40) or A (1-42) peptides for 24 h at 37°C,

and the presence of larger oligomeric and fibrillar components was evaluated by fluorescent quantification of ThT binding. For this particular assay, recombinant apolipoproteins were challenged to A (1-40), but also to A (1-42) because it has demonstrated stronger amyloidogenic and fibrillogenic properties than the A (1-40) peptide in vitro [33, 34]. We observed that both rApoJ and rApoA1 prevented the percentage of fluorescence emitted upon binding to

fibrils and oligomers formed by A (1-40) or A (1-42) in a concentration-dependent manner (Fig. 1C-D), as previously described for the native proteins [20, 23]. We confirmed that the presence of the recombinant proteins in the apical compartment of the system did not modify the permeability coefficient values for the LY tracer (Fig. 1E-F), which indicated that 200 nM of rApoA1 or rApoJ did not alter the BBB integrity or cause toxicity to MB CECs.

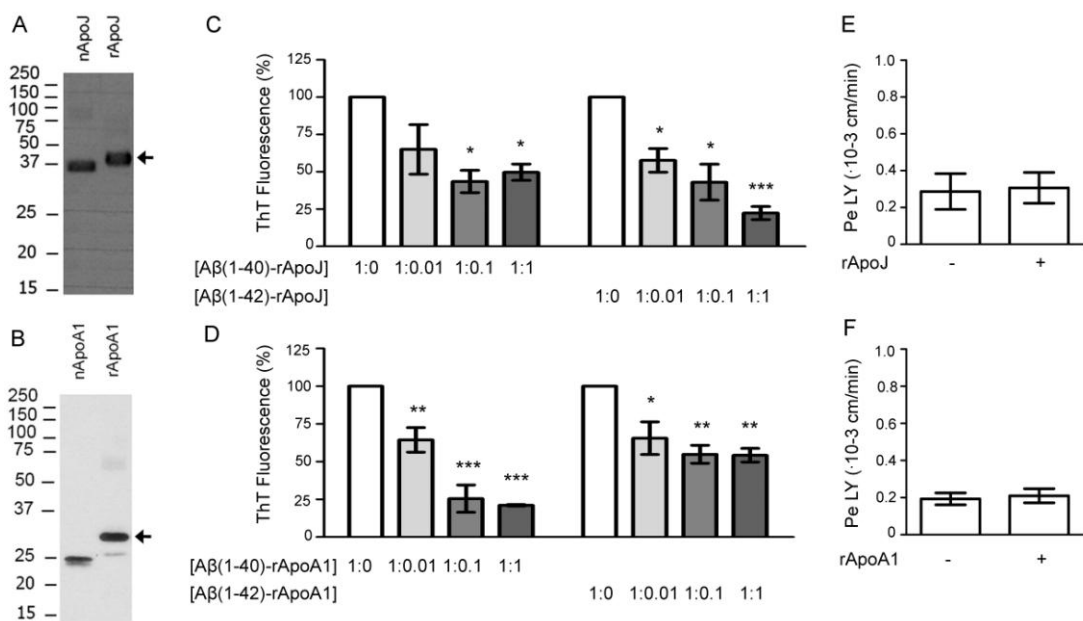


Figure 1 Human rApoJ and rApoA1 production and characterization. A-B) Western-blotting results of human native (n) or purified recombinant (r) ApoJ and ApoA1. The rApoJ (39 kDa) and rApoA1 (33 kDa) bands are indicated by arrowheads. C-D) Effect of rApoJ and rApoA1 on Aβ(1-40) and Aβ(1-42) aggregation and fibrillization assessed using Thioflavin T (ThT) methodology. The data are calculated as a percentage of the control in each independent experiment. Each bar represents the mean ± SEM of at least four independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. E-F) Impact of 200 nM of human rApoJ and rApoA1 on the integrity of the endothelial cell monolayer using Lucifer Yellow (LY) as a marker of paracellular transport.

Fluorescently labeled-A (1-40) transcytosis in vitro

After 5 days of extraction and isolation, MB CECs reached the suitable confluence and formed a monolayer on the inserts. Low permeability to the Lucifer yellow (LY) tracer, as evidenced by a Pe coefficient $< 1 \cdot 10^{-3}$ cm/min., confirmed the expression of well-differentiated tight and adherent junctions that limit paracellular passage across the BBB. Expression of CD31 was determined to evaluate the cell projection area of confluent cultures (Fig 2A2) and ZO-1 expression confirmed the formation of completely tight endothelial cell monolayers (Fig 2A1). To study the A (1-40) clearance from the brain to the bloodstream across the BBB, the basolateral-to-apical efflux of increasing doses of fluorescently labeled-A (1-40) was evaluated with the in vitro model after 3 h incubation. As expected, A (1-40) transport was saturated at higher concentrations. This receptor-mediated transport showed an equilibrium binding constant (K_d) of 36 ± 17 nM. In comparison, the efflux of [H^3]inulin, which is a metabolically inert marker that is not transported across the BBB [6], was determined radiometrically and presented a non-specific transport

across the MB CECs (Fig 2B). A (1-40) was not toxic to endothelial cells within the dose range assayed (6-120 nM) (Fig 2C) assessed by the MTT reduction assay; in addition, a lack of impaired LY passage after a non-fluorescent A (1-40) treatment showed that BBB permeability was not altered (Supplemental Fig. 1). The clearance experiments were performed using 12 nM A (1-40), which is below the K_d and therefore desired for affinity enhancement studies. Furthermore, the involvement of the more common receptors of A (1-40) at a vascular level were evaluated in our model. We then tested the effect on A (1-40) efflux of the exposure of RAP, which blocks both receptors, and we observed a reduction of $41.2 \pm 8.7\%$ on the appearance of the fluorescent signal at the apical compartment (Fig. 2E). To confirm that A (1-40) efflux was mediated by the LRP receptor family, a human A (1-40) ELISA kit was used to analyze the A (1-40) concentration after 3 h of transport across the endothelial monolayer. The results were equivalent to those obtained from the fluorometric assay; the presence of RAP significantly reduced the A (1-40) basolateral-to-apical efflux (Fig. 2E)

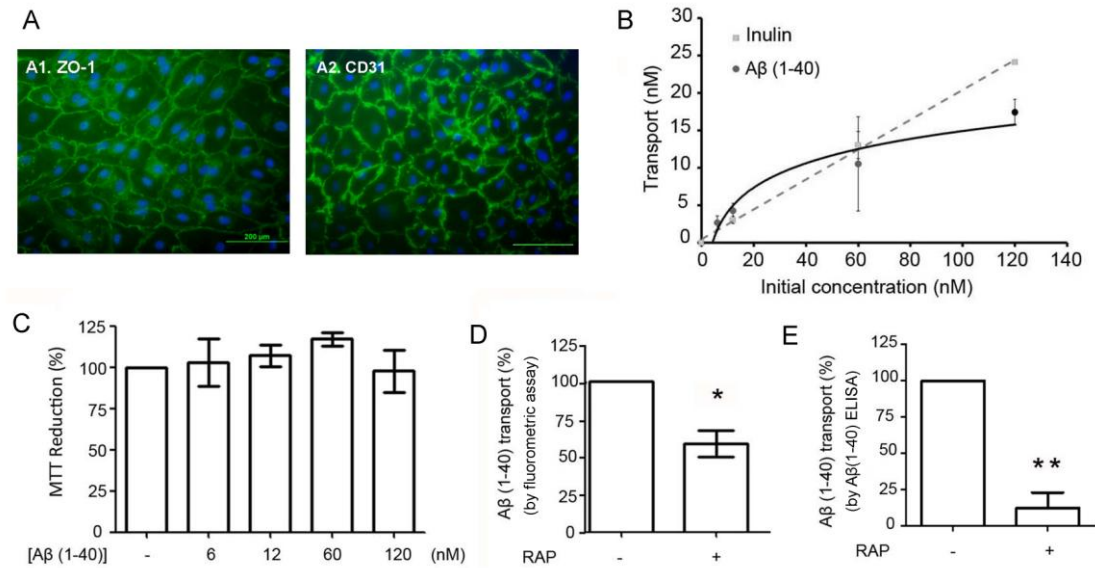


Figure 2 Aβ(1-40) efflux across the in vitro BBB model. **A1)** ZO-1 and **A2)** CD31 immunostaining of the capillary endothelial cell monolayer reflects the tightness of the BBB model. Nuclei are in blue (DAPI), Bars = 200µm. **B)** Basolateral-to-apical efflux of different concentrations (1-120 nM) of Aβ(1-40)- HiLyteFluor™488 (solid line) or 3H-inulin (dashed line) across the in vitro BBB model after a 3 h incubation. **C)** MTT measurements after 3 h incubation with Aβ(1-40). **D)** Basolateral-to-apical Aβ(1-40) passage after RAP incubation assessed by fluorometric assay, or **E)** by Aβ(1-40)-ELISA. The data are calculated as a percentage of the control in each independent experiment. Each bar represents the mean ± SEM of at least four independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01.

Apical-to-basolateral transport of rApoA1 and rApoJ across the BBB

Human rApoA1 and rApoJ apical-to-basolateral influx was evaluated to study their permeability across the BBB. After a 3 h incubation with rApoA1 or rApoJ on the apical side (donor compartment corresponding to the blood side), their presence in the basolateral side (acceptor compartment corresponding to brain side) was detected by western-blotting. We observed that the transport was modulated in both cases by the blockage of receptors from the LRP family

because the incubation of endothelial cells with 200 nM RAP decreased the trafficking of rApoA1 and rApoJ to the acceptor compartment (Fig 3A). We determined that rApoA1 and rApoJ crossed the BBB through a receptor-mediated transport because the passage of increasing doses of the recombinant proteins (20-2000 nM) into the basolateral compartment was saturated after 3 h incubation. The K_d values were 76.18 ± 54.76 nM and 137.8 ± 113.1 nM for rApoA1 and rApoJ, respectively (Supplemental Fig. 2). On the other hand, as a simulation of an excess of A in the brain, we determined whether the

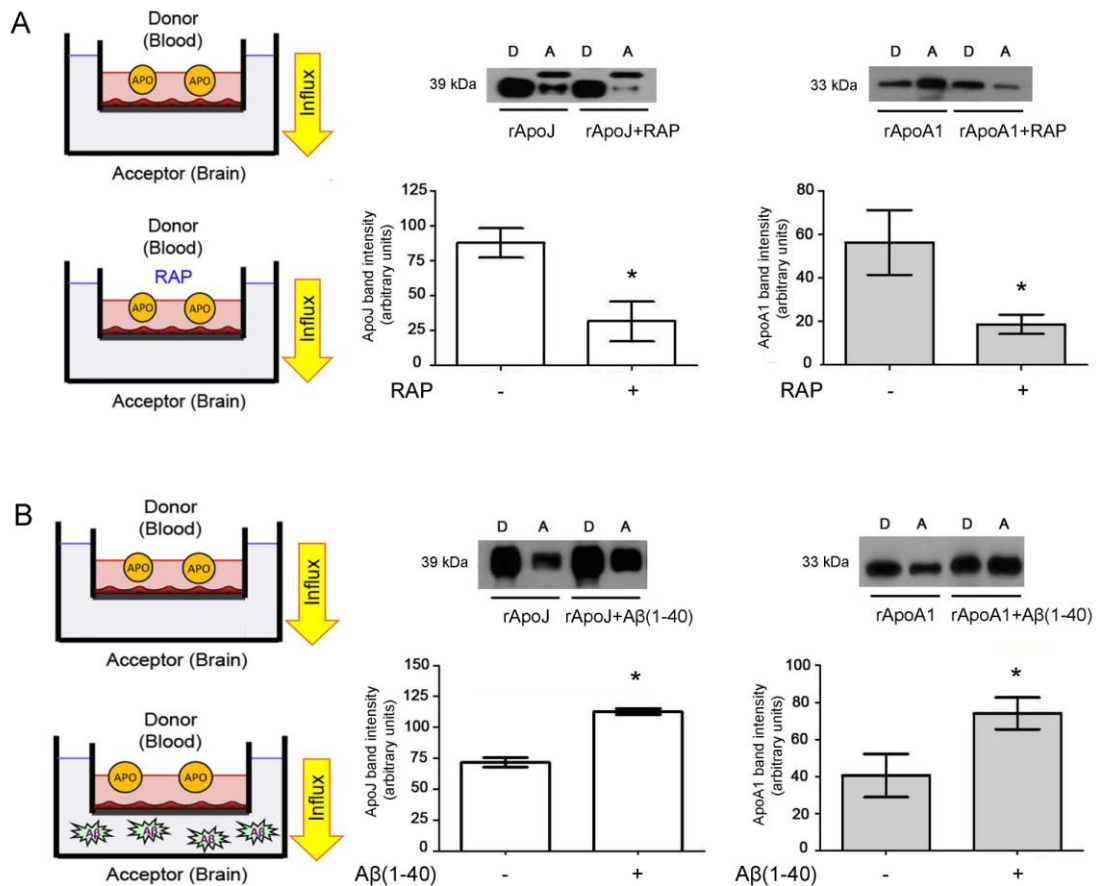


Figure 3 Modulation of human rApoJ and rApoA1 influx across the in vitro BBB model. A) Apical-to-basolateral influx of rApoJ and rApoA1 (200 nM) modulated by the incubation of RAP (200 nM) in the apical compartment 1 h prior to treatment. **B)** Influx of rApoA1 and rApoJ (200 nM) modulated by the presence of Aβ(1-40) (12 nM) in the basolateral compartment. rApoA1 and rApoJ in the supernatants from the donor (apical) and the immunoprecipitated acceptor compartment (basolateral) were detected using western-blotting. D= donor compartment; A= acceptor compartment. The data represent the mean ± SEM of the band intensity corresponding to the acceptor compartment (basolateral) from at least four independent experiments. * p <0.05.

presence of A (1-40) in the basolateral side modified the penetration rate of rApoA1 and rApoJ. In both cases, we observed an enhanced influx after 3 h incubation. The levels of rApoA1 or rApoJ were increased in the acceptor compartment when 12 nM A (1-40) was present on the opposite side of the Transwell (Fig. 3B).

Effect of human rApoA1 and rApoJ on A (1-40) clearance across the BBB

To study the effect of rApoJ and rApoA1 on A (1-40) clearance, two types of experiments were carried out. Firstly, fluorescently labeled-A (1-40) was added to the basolateral compartment (corresponding to the brain side) and increasing

concentrations of the recombinant apolipoproteins (0, 50 and 200 nM) were added to the apical compartment (corresponding to the blood side). At the highest concentration tested, we observed that whereas rApoJ did not alter the A (1-40) passage, rApoA1 enhanced the basolateral-to-apical A (1-40) efflux (Fig 4).

apical-to-basolateral compartment, we examined if the transport of fluorescently labeled-A (1-40) could be modulated by complexing the peptide to rApoJ or rApoA1. The complexes were formed by incubating of the peptide with the corresponding recombinant proteins ON at 37°C. The detection of

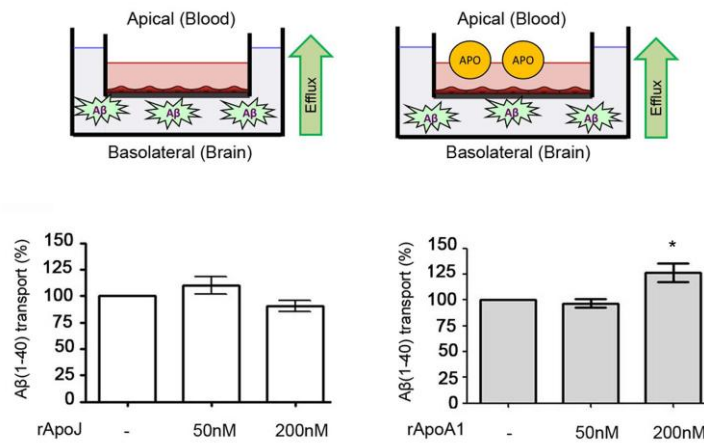


Figure 4 Aβ(1-40) clearance across the in vitro BBB model modulated by rApoJ or rApoA1. Effect of 3 h incubation of rApoJ or rApoA1 (50 or 200 nM) in the apical compartment on the Aβ(1-40) HiLyte™ Fluor 488-labeled (12 nM) basolateral-to-apical efflux. The data are calculated as a percentage of the control in each independent experiment. Each bar represents the mean ± SEM of at least four independent experiments. * p < 0.05.

Western-blotting and qPCR results showed that this increase was not due to a change in LRP1 or LRP 2 expression after 3 h incubation with rApoA1 on the apical side (Supplemental Fig. 3).

Second, because we previously observed that both rApoA1 and rApoJ were able to cross the BBB from the

high molecular weight species through anti-A western-blotting confirmed that both recombinant proteins bound to the fluorescently labeled-A (1-40) and formed complexes; rApoA1-A (1-40) and rApoJ-A (1-40) (Fig 5A). The formation of the corresponding complexes was verified by the detection

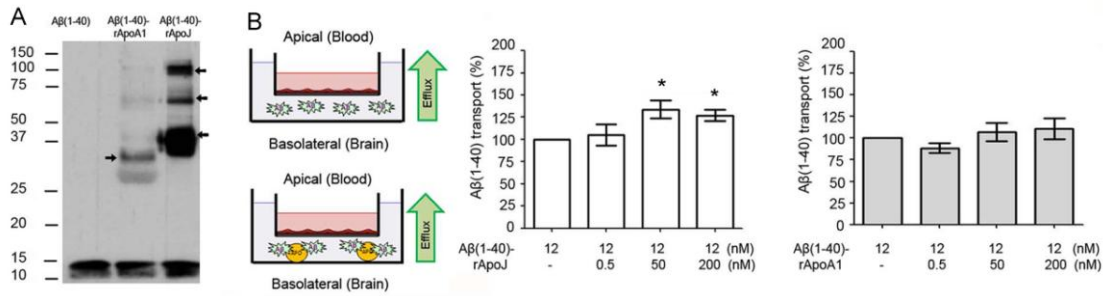


Figure 5 A β (1-40) clearance across the in vitro BBB model when complexed to rApoJ and rApoA1. **A)** Complexes of A β (1-40)-rApoJ and A β (1-40)-rApoA1 were detected by western-blotting using anti-4G8+6E10 A β antibodies. The principal protein complexes with A β (1-40) are indicated by arrowheads. **B)** A β (1-40) HiLyte™ Fluor 488-labeled (12 nM) basolateral-to-apical efflux for 3 h when complexed to rApoA1 or rApoJ. The data are calculated as a percentage of the control in each independent experiment. Each bar represents the mean \pm SEM of at least four independent experiments. * $p < 0.05$.

of ApoA1 or ApoJ in each case (Supplemental Fig. 4). In this case, we observed that A (1-40) clearance was enhanced when the peptide was complexed to rApoJ, whereas the complex formed with rApoA1 was not able to mobilize A (1-40) from the basolateral compartment (Fig. 5B).

Finally, the donor compartment was treated with rApoA1-A (1-40) or rApoJ-A (1-40) complexes to determine the effect of A (1-40) on the modulation of rApoA1 or rApoJ efflux across the BBB. When compared with the trafficking of free rApoA1 or rApoJ proteins through the endothelial monolayer, rApoJ basolateral-to-apical efflux was increased when complexed to A (1-40); however, the appearance of rApoA1 in the apical compartment

was reduced when bound to the amyloid peptide (Fig. 6).

DISCUSSION

The pathological accumulation of A in the brain parenchyma and vessel walls is one of the major hallmarks of AD. To investigate the mechanisms that can promote A removal from the brain, we used an in vitro BBB model and fluorometric assay to study the clearance of cerebral A (1-40). We demonstrated that our model mimics the in vivo conditions of saturated A (1-40) receptor-mediated transcytosis, mainly via an LRP family member, as previously described [6, 8, 9].

Currently, there is no treatment that improves the outcome of patients

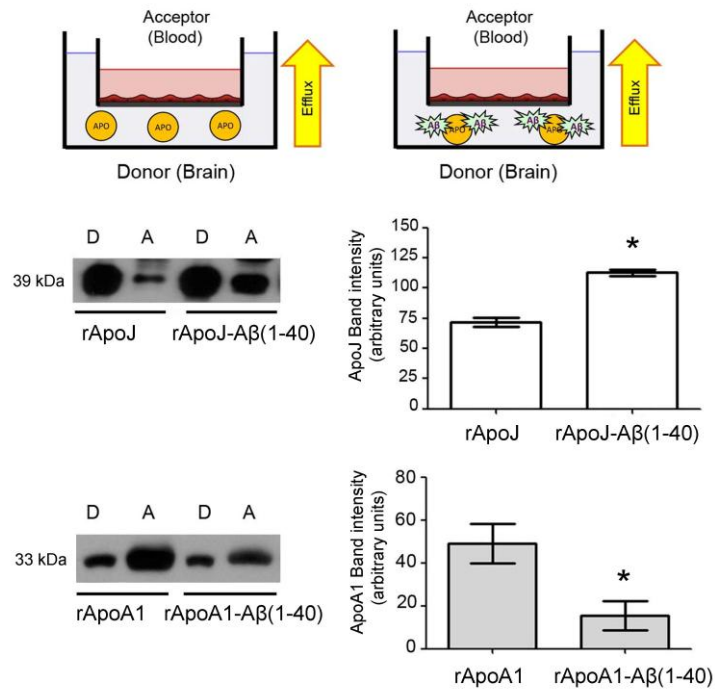


Figure 6 rApoJ and rApoA1 efflux across the in vitro BBB model when complexed to A (1-40). A) rApoJ and B) rApoA1 (200 nM) basolateral-to-apical efflux during 3 h when complexed to A (1-40) (12 nM) for 24 h at 37°C. Supernatants from donor (apical) and immunoprecipitated acceptor compartments (basolateral) were detected using western-blotting. D= donor compartment; A= acceptor compartment. The data represent the mean \pm SEM of the band intensity corresponding to the acceptor compartment (apical) from at least four independent experiments.* $p < 0.05$.

suffering from A β -related pathologies, such as AD or CAA. Therefore, proteins that bind A β material, prevent its aggregation and modulate its transport may be powerful therapeutic tools for these diseases. In this regard, increasing evidence suggests that apolipoproteins are involved in A β fibrillogenesis and clearance [9, 20, 23, 35, 36], and genetic variations in the corresponding genes are associated with AD and CAA severity and incidence [12, 13]. Currently, the most relevant protein of the family is ApoE. In addition to other functions directly or indirectly related to A β , ApoE has been extensively

implicated in A β clearance through the cerebrovascular system depending on the isoform [29, 37, 38]; however, its exact role in the process remains controversial [39].

Both ApoA1 and ApoJ are known to bind A β and prevent its aggregation and toxicity [16, 23, 24, 40]; thus, we investigated their role in the modulation of A β (1-40) flux from the brain to the bloodstream across cerebral cultured endothelial cells. We produced recombinant human ApoJ and ApoA1 and confirmed that both molecules inhibited the aggregation of soluble A β (1-42) into oligomeric forms, as

previously described for the native proteins [20, 23]. Next, we investigated the trafficking of human rApoJ and rApoA1 in both directions across the BBB. We confirmed that both proteins crossed the BBB without effecting LY permeability. Furthermore, incubation with RAP decreased the presence of the recombinant proteins in the opposite compartment of the BBB model. This finding suggests that rApoA1 and rApoJ crossed the endothelial monolayer from the apical to the basolateral side through a receptor of the LRP family. Whereas previous reports showed that ApoJ crossed the BBB via LRP 2 [9, 35], to our knowledge, the receptors involved in ApoA1 transcytosis have yet to be elucidated. Further experiments are required to confirm the specific receptor involved in the passage of ApoA1 across the BBB under predetermined conditions. In fact, ApoA1 is considered to be able to cross the BBB [41] because it has been found in the CSF and throughout the brain [42], although the mechanisms behind this trafficking are not well described. We observed that the incubation of A (1-40) in the system compartment corresponding to the brain side enhanced the passage of rApoJ and rApoA1 from the bloodstream into the brain. We speculate that an apical molecular signal

activated in the presence of the basolateral A (1-40) may enhance the influx of rApoJ and rApoA1. Nevertheless, our data suggest that the role of both chaperones may be more relevant in brains with a pathological accumulation of A. In this regard, while ApoA1 is mainly synthesized in the liver, it has been found associated to senile plaques in AD [21, 22]. It is not completely clear whether this plaque-associated ApoA1 comes from the periphery [43] or is expressed by particular brain cells, such as endothelial capillary cerebral cells [44, 45].

On the other hand, we demonstrated that both apolipoproteins modulated A clearance from the brain to the blood depending on their concentration and location. In our BBB model formed by a tight monolayer of MB CECs, we confirmed that A (1-40) efflux was mediated by LRP1, as previously shown in mouse models [6, 7] and human endothelial cells [7, 46], but not in bovine endothelial cells [47]. In our system, we observed that high concentrations of rApoJ bound to A (1-40) enhanced its clearance. This finding is in accordance with previous in vivo studies that administered radiolabeled A (1-40) in a guinea pig model [48] or

A (1-42) in mice [9]. These studies demonstrated that the principal route of ApoJ-A complex clearance from the brain was through LRP2. Because ApoJ is expressed by different brain cells [14] that are co-located with A fibrils in brain damage regions affected by A [16], and because LRP1 expression (the main receptor involved in A clearance) is decreased in AD or in the normal aging process [49, 50], ApoJ might be considered a cerebral A carrier using alternative elimination routes from the brain. In contrast, incubation with increasing levels of rApoA1 in the apical chamber (blood side) of the system improved the elimination of A (1-40) from the basolateral compartment (brain side). In this regard, previous reports showed a decrease in plasma ApoA1 in AD and dementia patients [51, 52] and this decrease correlated with the severity of the disease [53]. Therefore, plasma ApoA1 may represent a physiological decoy for soluble A produced in the CNS. Alternatively, cerebral A accumulation may cause a peripheral ApoA1 reduction by attracting the apolipoprotein into the brain across the BBB. Indeed, this would explain our finding that the A (1-40)-rApoA1 complex retains the apolipoprotein and blocks clearance to the apical side.

Nevertheless, studies using APP transgenic mice showed that the deletion of mouse ApoA1 worsened memory deficits [54]. Likewise, the overexpression of ApoA1 in an AD mouse model did not change parenchymal A load but improved the cognitive deficiency and reduced the accumulation of A in cerebral vessels [55]. Overall, peripheral ApoA1 appears to reduce the vascular A load and the inflammation associated with its deposition. On the other hand, a recent study has confirmed the importance of ApoE and ApoA1 in cognition; the double deletion of both apolipoproteins causes cognitive deficits independent of the favorable effect on amyloid pathology unexpectedly observed in APP/PS1dE9 mice crossed with ApoE/ApoA1 double knock out mice [56]. Finally, ApoA1/HDL possesses anti-inflammatory and anti-oxidative properties, modulates immune function at the cellular level [57] and can transiently reduce brain A soluble levels in an experimental model of AD [58]. Therefore, the peripheral administration of rApoA1 may induce protective effects by promoting soluble A clearance and avoiding further consequences of its accumulation, such as inflammation and neurodegeneration.

In conclusion, the present study demonstrated that the presence and localization of ApoJ, but also ApoA1, influenced A (1-40) clearance in an in vitro BBB model. The modulation of the balance of these apolipoproteins between the periphery and the brain may be an effective therapeutic strategy for AD and CAA.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (CP12/03259 and PI14/01134) at the Carlos III Institute of Health, Spain and Fundació La Marató de TV3 [40/U/2014]. The Neurovascular Research Laboratory is part of the *INVICTUS* network (RD12/0014/0005). C.M-Z is supported by a fellowship (FI12/00089) and M.H-G is supported by the Miguel Servet program (CP12/03259) at the Carlos III Institute of Health, Spain. J.S-P received doctoral fellowships from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. F.G was supported by a grant from the French foundation Coeur et Artères (Grant 06T6).

CONFLICTS OF INTEREST

None

REFERENCES

- [1] Yamada M (2000) Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* **20**, 8-22.
- [2] Attems J (2005) Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. *Neuropathol* **110**, 345-359.
- [3] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**, 1774.
- [4] Bell RD, Zlokovic BV (2009) Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**, 103-13.
- [5] Gosselet F, Saint-Pol J, Candela P, Fenart L (2013) Amyloid- peptides, Alzheimer's disease and the blood-brain barrier. *Curr Alzheimer Res* **10**, 1015-33.
- [6] Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* **106**, 1489-99.
- [7] Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P,

- Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* **9**, 907-13.
- [8] Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu H.W, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004) LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A beta isoforms. *Neuron* **43**, 333-44.
- [9] Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV (2007) Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 909-918.
- [10] Candela P, Gosselet F, Saint-Pol J, Sevin E, Boucau MC, Boulanger E, Cecchelli R, Fenart L (2010) Apical-to-basolateral transport of amyloid-peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J Alzheimers Dis* **22**, 849-59.
- [11] Zlokovic BV (2004) Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* **89**, 807-11.
- [12] Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9649-53.
- [13] Greenberg SM, Rebeck GW, Vonsattel JP, Gomez-Isla T, Hyman BT (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol* **38**, 254-9.
- [14] Charnay Y, Imhof A, Vallet PG, Kovari E, Bouras C, Giannakopoulos P (2012) Clusterin in neurological disorders: molecular perspectives and clinical relevance. *Brain Res Bull* **88**, 434-43.
- [15] Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Leteurtier L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O; European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**, 1094-9.
- [16] Matsubara E, Soto C, Governale S, Frangione B, Ghiso J (1996) Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *Biochem J* **316**, 671-9.
- [17] Koudinov AR, Matsubara E, Frangione B, Ghiso J (1994) The soluble form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 1164-71.

- [18] Koudinov AR, Berezov TT, Kumar A, Koudinova NV (1998) Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin Chim Acta* **270**, 75-84.
- [19] Schrijvers EM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM (2011) Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA* **305**, 1322–1326.
- [20] Matsubara E, Frangione B, Ghiso J (1995) Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J Biol Chem* **270**, 7563-7.
- [21] Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B (1995) Conformational mimicry in Alzheimer's disease. Role of apolipoproteins in amyloidogenesis. *Am J Pathol* **147**, 238-44.
- [22] Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ (1996) Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **66**, 2429-35.
- [23] Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterova MI, Lazo JS (2001) Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry* **40**, 3553-60.
- [24] Paula-Lima AC, Tricerri MA, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Oliveira FF, Magdesian MH, Grinberg LT, Panizzutti R, Ferreira ST (2009) Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents A beta-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1361-70.
- [25] Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, LaRue B, Guo H, Wu Z, Holtzman DM, Zlokovic BV (2005) IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *J Neurosci* **25**, 11495-503.
- [26] Saint-Pol J, Vandenhoute E, Boucau MC, Candela P, Dehouck L, Cecchelli R, Dehouck MP, Fenart L, Gosselet F (2012) Brain pericytes ABCA1 expression mediates cholesterol efflux but not cellular amyloid-peptide accumulation. *J Alzheimers Dis* **30**, 489-503.
- [27] Saint-Pol J, Candela P, Boucau MC, Fenart L, Gosselet F (2013) Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of Aβ peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells. *Brain Res* **1517**, 1-15.
- [28] Bachmeier C, Mullan M, Paris D (2010) Characterization and use of human brain microvascular endothelial cells to examine -amyloid exchange in the blood-brain barrier. *Cytotechnology* **62**, 519-29.
- [29] Bachmeier C, Paris D, Beaulieu-Abdelahad D, Mouzon B, Mullan M, Crawford F (2013) A multifaceted role for apoE in the clearance of beta-amyloid across the blood-brain barrier. *Neurodegener Dis* **11**, 13-21.
- [30] Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, Delplace Y, Miller F, Landry C, Morissette C, Fenart L, Cecchelli R, Tremblay P, Dehouck B (2005) Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* **85**, 734-46.

- [31] Culot M, Lundquist S, Vanuxeem D, Nion S, Landry C, Delplace Y, Dehouck MP, Berezowski V, Fenart L, Cecchelli R (2008) An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro* **22**, 799-811.
- [32] Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* **274**, 25945–25952.
- [33] Chen YR, Glabe CG (2006) Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides A β 40 and A β 42: stable trimer or tetramer formation by A β 42. *J Biol Chem* **281**, 24414-22.
- [34] Pauwels K, Williams TL, Morris KL, Jonckheere W, Vandersteen A, Kelly G, Schymkowitz J, Rousseau F, Pastore A, Serpell LC, Broersen K (2012) Structural basis for increased toxicity of pathological A β 42:A β 40 ratios in Alzheimer disease. *J Biol Chem* **287**, 5650–5660.
- [35] Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, Frangione B, Ghiso J (1996) Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4229-34.
- [36] Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Governale S, Miguel C, Miao W, McComb JG, Frangione B, Ghiso J, Zlokovic BV (1997) Isoform-specific effects of apolipoproteins E2, E3, and E4 on cerebral capillary sequestration and blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid beta. *J Neurochem* **69**, 1995-2004.
- [37] Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV (2008) ApoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* **118**, 4002-13.
- [38] Ito S, Ohtsuki S, Kamiie J, Nezu Y, Terasaki T (2007) Cerebral clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes. *J Neurochem* **103**, 2482-90.
- [39] Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2014) ApoE and A in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron* **81**, 740-54.
- [40] Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B (1993) The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J* **293**, 27-30.
- [41] Balazs Z, Panzenboeck U, Hammer A, Sovic A, Quehenberger O, Malle E, Sattler W (2004) Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *J Neurochem* **89**, 939-50.
- [42] Dietschy JM, Turley SD (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* **12**, 105-112.
- [43] Stukas S, Robert J, Lee M, Kulic I, Carr M, Tourigny K, Fan J, Namjoshi D, Lemke K, DeValle N, Chan J, Wilson T, Wilkinson A,

- Chapanian R, Kizhakkedathu JN, Cirrito JR, Oda MN, Wellington CL (2014) Intravenously injected human apolipoprotein A-I rapidly enters the central nervous system via the choroid plexus. *J Am Heart Assoc* **3**, e001156.
- [44] Möckel B, Zinke H, Flach R, Weiss B, Weiler-Güttler H, Gassen HG (1994) Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium in vitro. *J Neurochem* **62**, 788-98.
- [45] Gosselet F, Candela P, Sevin E, Berezowski V, Cecchelli R, Fenart L (2009) Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res* **1249**, 34-42.
- [46] Qosa H, Abuasal BS, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, Keller JN, Kaddoumi A. Differences in amyloid-clearance across mouse and human blood-brain barrier models: kinetic analysis and mechanistic modeling. *Neuropharmacology*. 2014 Apr;79:668-78.
- [47] Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, Fenart L (2015) In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res*. **1594**, 15-26.
- [48] Zlokovic BV, Mackic JB, McComb JG, Weiss MH, Kaplowitz N, Kannan R (1994) Evidence for transcapillary transport of reduced glutathione in vascular perfused guinea-pig brain. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 402-8.
- [49] Jaynes B, Provias J (2008) Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. *Curr Alzheimer Res* **5**, 432-7.
- [50] Silverberg GD, Messier AA, Miller MC, Machan JT, Majmudar SS, Stopa EG, Donahue JE, Johanson CE (2010) Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 1034-43.
- [51] Kawano M, Kawakami M, Otsuka M, Yashima H, Yaginuma T, Ueki A (1995) Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* **239**, 209-11.
- [52] Saczynski JS, White L, Peila RL, Rodriguez BL, Launer LJ (2007) The relation between apolipoprotein A-I and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Am J Epidemiol* **165**, 985-92.
- [53] Merched A, Xia Y, Viskovik S, Serot JM, Siest G (2000) Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**, 27-30.
- [54] Lefterov I, Fitz NF, Cronican AA, Fogg A, Lefterov P, Kodali R, Wetzel R, Koldamova R (2010) Apolipoprotein A-I deficiency increases cerebral amyloid angiopathy and cognitive deficits in APP/PS1DeltaE9 mice. *J Biol Chem* **285**, 36945-57.
- [55] Lewis TL, Cao D, Lu H, Mans RA, Su YR, Jungbauer L, Linton MF, Fazio S, LaDu MJ, Li L (2010) Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral

amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* **285**, 36958-68.

[56] Fitz NF, Tapias V, Cronican AA, Castranio EL, Saleem M, Carter AY, Lefterova

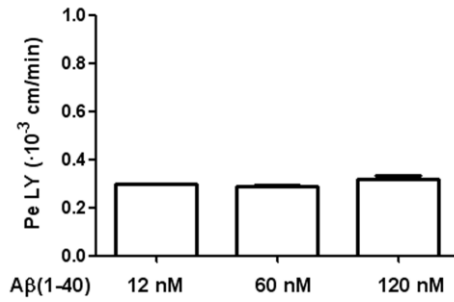
M, Lefterov I, Koldamova R (2015) Opposing effects of Apoe/Apoa1 double deletion on amyloid- pathology and cognitive performance in APP mice. *Brain* **138**, 3699-715.

[57] Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM (2004) Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* **95**, 764-772.

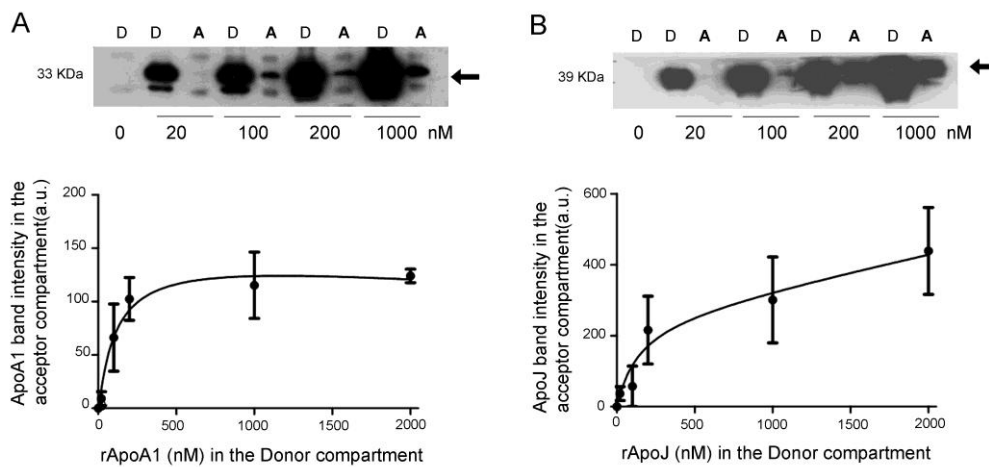
[58] Robert J, Stukas S, Button E, Cheng WH, Lee M, Fan J, Wilkinson A, Kulic I, Wright SD, Wellington CL (2015) Reconstituted high-density lipoproteins acutely reduce soluble brain A levels in symptomatic APP/PS1 mice. *Biochim Biophys Acta*. Oct 9.

Supplemental Material

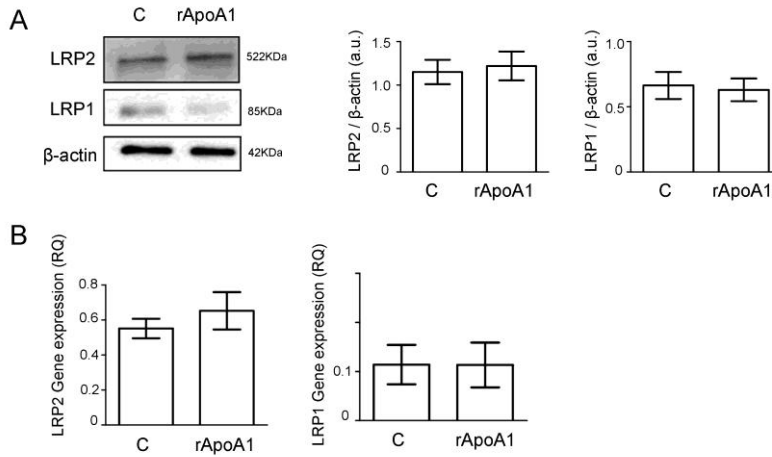
Supplemental Figure 1. Determination of Lucifer Yellow (LY) permeability after the treatment with 12nM non-fluorescent A β (1-40) treatment in the apical compartment. Each bar represents mean \pm SEM of three independent experiments.



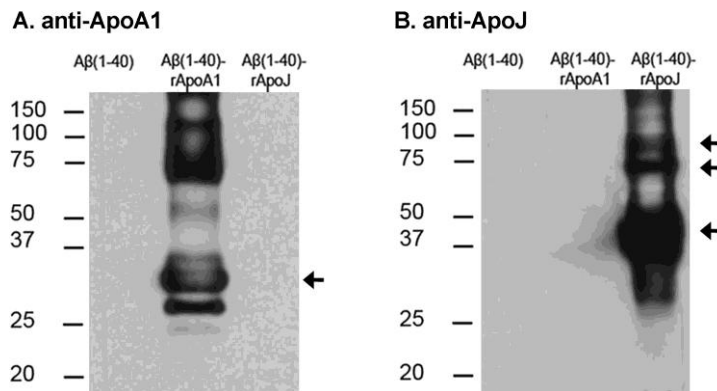
Supplemental Figure 2. Human rApoJ and rApoA1 influx across the in vitro BBB model. Apical-to-basolateral influx of (A) rApoA1 and (B) rApoJ; Representative membranes showing the recombinant protein levels in the supernatants from the donor (apical) and the acceptor (basolateral) compartments detected by western-blotting. The data represent the mean \pm SEM of the band intensity corresponding to the acceptor compartment (basolateral) from three independent experiments. D= donor compartment; A= acceptor compartment. a.u.= arbitrary units of band intensity.



Supplemental Figure 3. (A) LRP1 and LRP 2 protein expression, determined by Western-blotting and, (B) LRP1 and LRP2 gene expression, determined by quantitative real-time PCR (qPCR), in MB EC after 3h treatment with 200 nM rApoA1. C= Control conditions. a.u.= arbitrary units of band intensity. Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments.



Supplemental Figure 4. A (1-40)-rApoJ and A (1-40)-rApoA1 complexes detected by western-blotting using (A) anti-ApoA1 and (B) anti-ApoJ antibodies, respectively. The principal protein complexes with A (1-40) are indicated by arrowheads.





Discusión de los resultados

1. Revisión sistemática de biomarcadores de la ICH primaria hasta la actualidad

En las últimas décadas, el ictus se ha considerado una de las emergencias clínicas más alarmantes en nuestra sociedad dada su alta incidencia, su elevada tasa de mortalidad y discapacidad, así como su repercusión económica y sociosanitaria (Díaz-Guzmán et al., 2012). De entre los subtipos de ictus, la HIC espontánea presenta una mayor gravedad, dando lugar a ratios de mortalidad más elevados (Godoy et al., 2015). No obstante, los estudios para investigar la fisiopatología del ictus se han centrado mayoritariamente en el ictus isquémico, por lo que muchos de los mecanismos moleculares asociados a la HIC aún se desconocen (Montaner, 2006).

Hasta la fecha, no existe un tratamiento eficaz para la HIC más allá del manejo y atención clínica por parte de los neurólogos, y su diagnóstico se realiza básicamente por técnicas de neuroimagen. El diagnóstico radiológico permite clasificar el tipo de ictus, determinar la etiología de la HIC, su progresión de la HIC y prevenir las principales complicaciones asociadas a la HIC. A pesar de su gran utilidad, estas técnicas son poco específicas y sensibles, son caras, y en ocasiones no son lo suficiente eficaces para el pronóstico del paciente. Es por ello que la investigación de moléculas biológicas o biomarcadores implicadas en la patología de la HIC es de vital importancia para entender mejor la heterogeneidad de la patología, para mejorar el manejo de la enfermedad y para el descubrimiento de nuevas terapias para la práctica clínica. En consecuencia, una parte de esta tesis se ha centrado en la búsqueda de biomarcadores que puedan asociarse a los procesos que inducen la HIC.

En particular, el hecho de diferenciar entre subtipos de ictus mediante biomarcadores, nos permitiría desarrollar un test bioquímico de diagnóstico rápido que podría conferir grandes ventajas de criba pre-hospitalaria y un mejor manejo de los pacientes con ictus. Por ello, el primer objetivo de la tesis fue hacer una búsqueda sistemática de los biomarcadores de subtipos de ictus: isquémico vs. hemorrágico. Así, como parte de la página Web (www.stroke-biomarkers.com, Ver Anexo) creada por nuestro laboratorio, se recogió toda la información relacionada con biomarcadores para distinguir el subtipo de ictus hasta la fecha 13/01/2016. Para considerar un biomarcador como posible candidato y hacerlo público en la Web, se tuvieron en cuenta dos criterios: que al menos 3 estudios diferentes analizaran el mismo biomarcador, o que, independientemente del número de estudios, la muestra total analizada

fuera mayor a 200 pacientes. Siguiendo estos criterios, se han estudiado y descrito 6 moléculas estudiadas de las cuales tan sólo 3 mostraron unos niveles estadísticamente diferentes dependiendo del subtipo de ictus (isquémico o hemorrágico). Como se describe en la Tabla 3, se han encontrado altos niveles en plasma de GFAP y S100B en los casos de HIC en la fase aguda, y una reducción de los niveles de RAGE soluble (sRAGE) en las primeras horas del evento hemorrágico. En el caso de la proteína C-reactiva (CRP), hay controversia sobre los resultados obtenidos en los diferentes estudios. Mientras que un estudio muestra niveles plasmáticos elevados en los casos de isquemia cerebral, dos estudios no determinaron ninguna diferencia significativa en los niveles según el subtipo de ictus. Por lo tanto y a la espera de más estudios, no podemos considerarlo un buen candidato.

Tanto el GFAP como S100B son considerados como marcadores prototípicos de astrocitos (Barres, 2008; Sofroniew & Vinters, 2010). Altos niveles en plasma de estas proteínas gliales sugieren el desacoplamiento y la disfunción de la unidad neurovascular, revelando el daño cerebral causado por la HIC. Por otro lado, RAGE es un receptor transmembrana multiligando miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y lo encontramos en las células endoteliales de la vasculatura cerebral, astrocitos y neuronas, pero también en células del sistema inmunitario. Mediante el corte enzimático del segmento C-terminal, se produce la forma soluble detectable en plasma. S100B es un ligando para el receptor RAGE y su unión provoca la activación de vías de señalización relacionadas con la respuesta inflamatoria e hipóxica (Donato et al., 2007). Además, RAGE desempeña un papel importante tanto en el desarrollo temprano y la progresión de la aterosclerosis y la inflamación vascular (Yan et al., 2006; Chang et al., 2008) y niveles altos de sRAGE se han asociado a un disfunción cardíaca a largo plazo (Jensen et al., 2015), lo cual podría explicar los altos niveles encontrados en los pacientes con ictus isquémico en comparación con la hemorragia intracerebral.

Por lo tanto, podemos concluir que 1) existen pocos estudios dirigidos a la búsqueda de biomarcadores de la HIC en comparación con el ictus isquémico, y 2) tan sólo existen 3 moléculas propuestas como posibles biomarcadores para distinguir el subtipo de ictus con indicios claros, teniendo en cuenta el número de estudios realizados (mínimo 3) y/o haber sido determinado en grandes cohortes (mayor de 200 pacientes).

Tabla 3. Biomarcadores del subtipo de ictus

Código Uniprot	Símbolo	Nombre	Asociación	Subtipo	Referencias
P04271	S100B	S100 Calcium Binding Protein B	Los pacientes con una HIC presentan niveles plasmáticos más elevados que los pacientes con un ictus isquémico en la fase aguda.	HIC	Montaner et al., 2012
P14136	GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Los pacientes con una HIC presentan niveles plasmáticos más elevados que los pacientes con ictus isquémico en la fase aguda.	HIC	Dvorak et al., 2008 Undén et al., 2009 Foerch et al., 2012
P16860	ANFB	Natriuretic peptides B, (BNP)	No se han encontrado diferencias significativas en los niveles entre los dos subtipos de ictus.	---	Koenig et al., 2007 Kim et al., 2010
P02768	ALBU	Albumin	No se han encontrado diferencias significativas en los niveles entre los dos subtipos de ictus.	---	Abboud et al., 2007 Gunduz et al., 2007 Herisson et al., 2010
Q15109	RAGE	Receptor for advanced glycosylation end products	Los pacientes con ictus isquémico presentan niveles de la forma de RAGE soluble en plasma más elevados que los pacientes con HIC en la fase aguda.	Ictus isquémico	Montaner et al., 2012
P02741	CRP	C-reactive protein	No se han encontrado diferencias significativas en los niveles entre los dos subtipos de ictus. Los pacientes con un ictus isquémico presentan niveles de CRP en plasma más elevados que los pacientes con HIC en la fase aguda.	---	Montaner et al., 2012 Modrego et al., 2008 Roudbary et al., 2011

2. Moléculas implicadas en la patología de HIC primaria: biomarcadores de etiología

Hasta la fecha, no existe ningún estudio dedicado a la identificación de biomarcadores que haga posible el diagnóstico de la etiología de HIC primaria. El único estudio realizado para la identificación de biomarcadores con este objetivo, fue llevado a cabo por Greenberg (2000) en el cual no se encontraron diferencias en los niveles de A β (1-40), A β (1-42) y TGF-1 en plasma de pacientes en fase crónica diagnosticados como HIC-AAC, HIC-HTA y controles. Creemos que la identificación de moléculas relacionadas con la etiología de la HIC primaria proporcionará una mejor comprensión de la patología y su evolución y nos ayudará al descubrimiento de nuevas dianas moleculares para futuras intervenciones terapéuticas. Además, en el caso de la HIC causada por una AAC, encontrar biomarcadores de la enfermedad nos podría servir para determinar la eficacia de posibles nuevos tratamientos y aumentar la seguridad de tratamientos contraindicados actualmente para la AAC, como la terapia anticoagulante.

Por ello, el propósito del estudio 1 fue diferenciar entre las dos etiologías de la HIC primaria, HIC-AAC y HIC-HTA, basándonos en las diferencias en la expresión génica en las células blancas de la sangre.

2.1 Búsqueda de biomarcadores hemorrágicos por tecnología de microarrays

Para el descubrimiento de nuevas moléculas implicadas en la patología que engloba la HIC primaria, se llevó a cabo un análisis de transcriptómica masivo mediante la tecnología de microarrays en leucocitos de pacientes con HIC primaria de etiología hipertensiva o de origen AAC. Previamente algunos autores ya habían resaltado el uso de esta tecnología para analizar los cambios de expresión para diferentes estados neuropatológicos. En el campo del ictus, el primer estudio que determinó la existencia de cambios en el perfil de expresión génica de las células blancas sanguíneas fue en 2001 utilizando un modelo en rata (Tang et al., 2001). Desde entonces, se han llevado a cabo investigaciones utilizando esta tecnología para la identificación de biomarcadores para la predicción de ictus isquémico (Tang et al., 2006; Stamova et al., 2010) o para el pronóstico de TH asociado al tratamiento trombolítico en el ictus (Fernández-Cadenas et al., 2013). Estos resultados muestran el potencial que puede tener el estudio de transcriptómica en células de la sangre para la evaluación diagnóstica y pronóstica en el campo del ictus hemorrágico.

Debido a que durante la fase aguda y subaguda los pacientes que sufren una HIC presentan una alteración en las moléculas inflamatorias debida a la hemorragia en sí (Wang y Doré, 2007; Qureshi, 2009; Brunswick, 2012) y no a la fisiopatología del subtipo de HIC, nuestro análisis se basó en el uso de muestras de pacientes con HIC en fase crónica (al menos 3 meses tras el último evento hemorrágico). Por todo ello, por primera vez hemos llevado a cabo un estudio de cribado masivo para encontrar biomarcadores sanguíneos de HIC primaria específicos de cada etiología.

Como describimos en el primer trabajo de esta tesis (Merino-Zamorano et al., 2015a), mediante el análisis por tecnología de microarrays, un total de 6 transcritos mostraron una alteración en su expresión en los casos de HIC-AAC, 28 fueron expresados diferencialmente en los casos HIC-HTA, y 31 en los casos ICH independientes de la etiología en comparación al grupo control. Tras el análisis de los resultados, se llevó a cabo un estudio de validación del perfil de expresión por RT-qPCR en una nueva cohorte. De los 3 grupos de estudio, se seleccionaron 11 genes, de los cuales ninguno mostró un perfil de expresión equivalente al que se encontró en el análisis por microarrays. Aún así, la expresión del gen *GOLGA8A* (*Golgin A8 Family Member*) que había mostrado niveles de expresión más elevados en el grupo HIC-HTA por microarrays, mostró diferencias entre pacientes con HIC en comparación a controles, independientemente de su etiología. Debido a la gran variabilidad génica interpersonal, creemos que el pequeño tamaño de la cohorte inicial utilizada podría afectar a nuestros resultados, por lo que no podemos descartar que existan diferencias transcriptómicas en leucocitos según la patología que causa la HIC.

Otro aspecto a tener en cuenta, es el proceso global de transcripción y maduración del RNA mensajero (mRNA) hasta la traducción de la proteína. Un estudio piloto reciente mediante la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS, del inglés *sequencing by synthesis technology*), ha demostrado que existen grandes diferencias a nivel de *splicing* alternativo génico en el mRNA de células sanguíneas entre los dos subtipos de ictus (isquémico y hemorrágico), lo que sugiere que las posibles diferencias existirían tras el procesamiento y maduración del éste y por lo tanto en las isoformas de las proteínas candidatas (Dysktra-Diello et al., 2015).

Por último, debemos considerar la baja sensibilidad de las técnicas de uso universal y/o rutina de laboratorio, como la RT-qPCR en comparación con la tecnología de microarrays. En este sentido, sería conveniente tener en cuenta las posibles diferencias debidas al *splicing* alternativo para la óptima elección de las sondas utilizadas para la detección por RT-qPCR. Teniendo en cuenta todo ello, nuestros resultados demuestran la dificultad de encontrar

biomarcadores a nivel transcriptómico específicos de etiología de HIC primaria a partir de las células blancas de la sangre. Aún así, un diseño experimental incluyendo un mayor número de pacientes para el *screening* inicial debería tenerse en cuenta para futuros estudios de búsqueda de biomarcadores.

2.2 GOLGA8A, ¿es un buen biomarcador de HIC primaria?

Como hemos explicado, de todos los genes analizados por RT-qPCR, ninguno mostró el perfil de expresión encontrado en el análisis por microarrays. Aún así, la expresión del gen *GOLGA8A* en leucocitos se encontraba significativamente más elevada en pacientes que habían sufrido una HIC (independientemente de la etiología) que en controles. Para determinar el valor como biomarcador y su implicación en la HIC, cuantificamos por inmunoensayo los niveles de la proteína *GOLGA8A* en una nueva cohorte. Como en el caso de su expresión génica en leucocitos, los niveles plasmáticos de *GOLGA8A* en pacientes que habían sufrido una HIC eran más elevados en comparación a los controles.

Por otro lado, en nuestro estudio, encontramos una correlación significativa en el aumento de expresión génica y niveles plasmáticos de *GOLGA8A* con el número de hemorragias que habían sufrido los pacientes de HIC. Para investigar esta posible asociación en nuestra cohorte, hipotetizamos que sus niveles podrían estar asociados a: 1) la recurrencia hemorrágica, característica clínica relevante especialmente en la AAC (Yamada, 2000; Greenberg et al, 2004), o 2) a procesos de neuroreparación durante la fase crónica del ictus hemorrágico. Para determinar el valor como biomarcador pronóstico de recurrencia hemorrágica, se hizo un seguimiento de nuevos eventos hemorrágicos en los 15 pacientes analizados y diagnosticados con posible/probable AAC. En este subgrupo, los pacientes que posteriormente a la extracción de sangre sufrían un nuevo evento hemorrágico presentaban una tendencia a tener niveles plasmáticos *GOLGA8A* más altos, sin llegar a obtenerse diferencias estadísticamente significativas. Por ello, consideramos que para poder evaluar su posible valor pronóstico de recurrencia hemorrágica en los casos HIC-AAC, se deberán llevar a cabo nuevos estudios prospectivos utilizando una mayor cohorte. La segunda hipótesis fue el posible papel de *GOLGA8A* en procesos de neuroreparación en la fase crónica de la HIC. Para ello, se cuantificó el volumen residual de la lesión durante la fase crónica en el TC y se correlacionó con los niveles de *GOLGA8A*. Aunque no se encontró ningún tipo de asociación, a falta de más estudios, no podemos descartar la posible implicación de *GOLGA8A* con procesos de regeneración tras una lesión cerebral.

La proteína GOLGA8A es una proteína localizada en el Aparato de Golgi y aunque no se sabe mucho acerca de su función, se piensa que podría estar relacionada con el mantenimiento de este orgánulo celular (Stinton et al., 2004). Se ha sugerido la posibilidad que tras la muerte celular, debido a la fragmentación del Aparato de Golgi, se generen diferentes formas de GOLGA8A potencialmente immunoestimulantes que darían lugar a la generación de auto-anticuerpos (Nozawa et al., 2002). Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos, no hay estudios que relacionen esta proteína con el ictus ni con desórdenes neurodegenerativos, por lo que es difícil especular sobre su posible implicación en esta patología.

En resumen, este es el primer análisis transcriptómico global para diferenciar la etiología de la HIC utilizando la tecnología de microarrays. Este trabajo pone de manifiesto las dificultades de encontrar nuevas moléculas relacionadas con los procesos inflamatorios específicos en pacientes que sufren una HIC-AAC o HIC-HTA utilizando una técnica de cribado masivo. Pero a su vez, hemos encontrado que los niveles aumentados de GOLGA8A en plasma están asociados a la fase crónica del ictus hemorrágico y a la presencia de múltiples hemorragias, siendo un posible candidato como biomarcador de recurrencia hemorrágica en los casos de HIC-AAC. Sin embargo, debido a la limitación de la pequeña muestra analizada, estos resultados deberían ser confirmados en una nueva y mayor cohorte para determinar el valor pronóstico de GOLGA8A en la HIC.

3 Identificación de nuevas moléculas implicadas en la HIC secundaria asociada al tratamiento trombolítico en el ictus isquémico

El segundo estudio de esta tesis (Merino-Zamorano et al., 2015b) va dirigido a la investigación de nuevas moléculas implicadas en los efectos deletéreos del r-tPA en condiciones isquémicas en la microvasculatura cerebral, particularmente la aparición de complicaciones hemorrágicas tras el tratamiento trombolítico. Para el descubrimiento de nuevas moléculas diana implicadas en el daño endotelial, se tuvieron en cuenta dos puntos importantes en el diseño experimental: el modelo con el cual se llevaron a cabo los ensayos *in vitro* y la técnica de *screening* masivo para la fase de “*discovery*”.

3.1 Uso de modelos *in vitro* para la búsqueda de biomarcadores de complicaciones asociadas al r-tPA en el ictus isquémico

A pesar de la eficacia ampliamente demostrada del r-tPA como tratamiento para el ictus isquémico agudo (Hacke et al., 1995; Hacke et al, 1998; Hacke et al, 2008), su actividad proteolítica también se ha asociado a posibles lesiones vasculares que inducen la formación de edema y complicaciones hemorrágicas (Ishrat et al., 2012). La aparición de TH sintomáticas da lugar a un mal pronóstico y aumenta la incidencia de la mortalidad en pacientes que han recibido r-tPA. Por lo tanto, creemos que el mantenimiento de la integridad de la microvasculatura cerebral es un reto importante para mejorar la seguridad del tratamiento trombolítico. La comprensión del papel del endotelio cerebral puede facilitar la identificación de biomarcadores predictivos de los efectos nocivos de este tratamiento. En este sentido, en nuestro estudio, seguimos una estrategia de cribado masivo para detectar cambios en el perfil de expresión génica de células endoteliales de cerebro humano sometidas a un tratamiento de r-tPA durante la privación de oxígeno y glucosa (POG), como modelo *in vitro* de isquemia cerebral. Concretamente, el modelo se basó en la exposición de cultivos de la línea celular endotelial humana hCMEC/D3 a la combinación de r-tPA (diferentes dosis) y POG durante un tiempo de 6h. Nuestro objetivo fue determinar las vías de señalización que se activan de forma tardía tras la administración del fármaco, no relacionadas con la actividad trombolítica y que podrían estar relacionadas con los efectos deletéreos en la BHE.

Los modelos *in vitro*, nos permiten estudiar una patología concreta fuera del organismo, a nivel celular o tisular, con un control exhaustivo de las variables fisicoquímicas (temperatura, pH, condiciones atmosféricas, presión osmótica, etc...). Por ello, son una herramienta muy importante e indispensable en el estudio de las neurociencias, y en particular en el campo del ictus, ya que permiten realizar estudios a nivel celular sobre procesos fisiológicos y fisiopatológicos, ensayos de toxicidad, estudios de expresión génica y proteica ante un estímulo patológico, para posteriormente validar su importancia clínica.

Un primer punto importante a tener en cuenta para el óptimo diseño experimental del estudio *in vitro* es la fuente endotelial de partida para los cultivos. En este estudio, escogimos la línea celular hCMEC/D3 por el origen de la línea celular, su fácil manipulación y su disponibilidad. Las células hCMEC/D3 representan la primera línea celular humana estable, completamente caracterizada y bien diferenciada de células endoteliales cerebrales (Weksler et al., 2005). Es importante destacar que tras su desarrollo en 2005, esta línea celular ha sido una de las más

utilizadas en el campo de la biología endotelial cerebral y la farmacología (Weksler et al., 2013).

En referencia al modelo de hipoxia, existen principalmente dos tipos de modelo que mimetizan la anoxia producida por las condiciones isquémicas. Por un lado, los agentes químicos, la cianida (KCN) que inhibe el citocromo C oxidasa, o la oligomicina que inhibe la ATP sintasa. Estos compuestos actúan a nivel mitocondrial alterando la cadena respiratoria celular. El segundo modelo, el que utilizamos en la presente tesis, es conocido como modelo de privación de oxígeno y glucosa, en el que se utiliza una cámara anaeróbica y medios de cultivos sin glucosa ni suplementos (Golberg y Choi, 1993). Este modelo nos permite de forma automatizada y sin añadir sustancias exógenas, controlar las condiciones de POG, facilitando el manejo del modelo y permitiendo unas condiciones más reproducibles a lo largo del estudio.

En cuanto a las dosis de r-tPA para tratar los cultivos, se utilizaron dosis de 13 $\mu\text{g/ml}$ o 100 $\mu\text{g/ml}$ de Actilyse (Boehringer, Ingelhem). La dosis de 13 $\mu\text{g/ml}$, la cual es comparable a la que se encuentra en plasma en los pacientes que reciben terapia trombolítica en la fase aguda del ictus isquémico, no resultó tóxica en nuestro modelo. En cambio, la dosis alta de 100 $\mu\text{g/ml}$ indujo una reducción de la viabilidad celular y un aumento de la citotoxicidad en nuestros cultivos en combinación con 6 horas de POG. Por ello, esta dosis fue utilizada para inducir *in vitro* los efectos deletéreos del r-tPA durante el estímulo isquémico.

3.2 Análisis transcriptómico por la tecnología de microarrays

En este estudio, utilizamos la tecnología de microarrays para identificar transcritos de moléculas que podrían estar implicadas en la disfunción endotelial inducida por la combinación de los estímulos tóxicos (100 $\mu\text{g/ml}$ r-tPA durante 6 horas de POG). De los resultados obtenidos, determinados genes fueron seleccionados para la replicación por RT-qPCR: API5 (del inglés, *Apoptosis inhibitor 5*), AVIL (*Advillin*), BCL10 (*B-cell lymphoma/leukemia-10*), THBS1 (*Thrombospondin 1*), los cuatro relacionados con la apoptosis celular; DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*), inhibidor en la vía de señalización Wnt (del inglés, *canonical Wntless-type pathway*) FGF5 (*Fibroblast growth factor 5*), implicado en la proliferación celular y señalización intercelular; NURR1 (*NR4A2, Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*), el cual es un factor de transcripción encargado de activar diferentes vías de señalización a partir de estímulos exógenos; y por último, NEDD9 (*Neural precursor cell expressed*), implicado en la adhesión celular.

En este caso, el 50% de los genes candidatos seleccionados, mostraron un patrón de expresión equivalente utilizando la técnica de microarrays o de RT-qPCR. A diferencia del artículo 1, se muestra un mayor éxito en los estudios de validación y replicación por RT-qPCR. Estos resultados eran esperables, puesto que las muestras analizadas parten de un estudio *in vitro* (condiciones controladas) y de una misma línea celular sin ningún tipo de variabilidad interna de las muestras, por lo que los cambios son totalmente atribuibles a las condiciones de estudio. Por tanto para futuros estudios, creemos que aunque la tecnología de microarrays es una herramienta útil de *screening* masivo, rápida, sensible y eficaz, es muy importante tener en cuenta tanto la variabilidad de la cohorte de estudio como el tamaño de muestra analizada para evitar falsos positivos, así como las técnicas existentes utilizadas para su posterior replicación.

3.3 NURR1 como marcador de daño endotelial

A partir de una búsqueda sistemática bibliográfica en el campo del ictus y enfermedades neurodegenerativas/ neuroinflamatorias, así como de una replicación de los resultados tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína por Western Blot, escogimos NURR1 como candidato. Se conoce que NURR1 es un factor de transcripción, expresado principalmente en células T y tejido cerebral (Law et al., 1992; Mages et al., 1994), en células gliales (Saijo K. et al., 2009), neuronas (Zetterstrom et al., 1997) y células endoteliales (Liu et al., 2003; O’Kane et al., 2008; Aherne et al., 2009). En ratones transgénicos con ausencia total y parcial de NURR1, se ha determinado su participación en el control de la respiración celular en diferentes áreas del cerebro y desempeña un papel clave en la respuesta a la hipoxia y la adaptación extrauterina en neonatos (Nsegbe et al., 2004). En modelos de MCAO llevados a cabo en diferentes especies, el papel de NURR1 no ha sido extensamente estudiado y los resultados obtenidos no son claros. De hecho, por una parte, se ha descrito una sobreexpresión de este gen en neuronas tras la oclusión permanente (Honkaniemi et al., 1997) y transitoria (Honkaniemi y Sharp, 1996) de la arteria cerebral media, en rata y gerbo respectivamente. Por otra, se ha observado una reducción en la expresión de la proteína NURR1 en los ganglios basales en un modelo transitorio de MCAO en ratón (Erdó et al., 2004). Hasta la fecha, ningún estudio había asociado el r-tPA como regulador de la expresión de NURR1.

En nuestro trabajo demostramos por primera vez, un aumento de expresión de NURR1 por parte del r-tPA (dosis dependiente) en condiciones isquémicas en células endoteliales cerebrales humanas. Además, pudimos determinar una correlación negativa entre la viabilidad

celular y la expresión de este gen. Por consiguiente, llevamos a cabo un estudio de silenciamiento génico para ver el impacto en la viabilidad celular y la respuesta inmune cuando la expresión de NURR1 (a nivel de gen y proteína) se encuentra disminuida. Por un lado, relacionamos la inhibición de la sobreexpresión endotelial de NURR1 con una reducción de la muerte celular. Asimismo, observamos que el silenciamiento génico de NURR1 durante el tratamiento con r-tPA y POG inducía una reducción de la respuesta inflamatoria, controlando la transcripción de genes pro-inflamatorios tales como NF- κ -B2 (del inglés *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 2*), IL1- α (*Interleukine 1 alpha*), ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), SMAD3 (*SMAD Family Member 3*), y CSF2 (*Colony Stimulating Factor 2*).

A partir de nuestros datos, podríamos pensar que la inhibición de NURR1 durante la trombolisis podría ser una estrategia prometedora para frenar la respuesta inflamatoria y evitar la disfunción endotelial. Aún así, y aparentemente en contradicción con nuestros resultados, otros autores han propuesto NURR1 como molécula neuroprotectora modulando la muerte celular en astrocitos y glia (Saijo K. et al., 2009). A nivel neuronal NURR1 juega un papel importante en la activación de la tirosina hidroxilasa (Sakurada et al., 1999) y es esencial para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas (Zetterstrom et al., 1997). De hecho, mutaciones en este gen se han relacionado con disfunciones dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (Xu et al., 2002; Zheng et al., 2003; Le et al., 2003). Debemos destacar, por ejemplo, que en estudios *in vitro*, otros autores han observado el papel protector de NURR1 como modulador de la respuesta neuroinmune (Saijo K. et al., 2009), como factor represor de la inflamación en macrófagos implicados en aterosclerosis (Bonta et al., 2006) y en la inhibición de la proliferación e inflamación en las células del músculo liso vascular (Bonta et al., 2010). Pero por otro lado, se sabe que la expresión aberrante de NURR1 está implicada en diferentes enfermedades inflamatorias periféricas como mediador de los procesos proinflamatorios/ inmunes, tales como artritis reumatoide (McEvoy et al, 2002; Aherne et al, 2009), psoriasis (O'Kane et al., 2008), y esclerosis múltiple (Doi et al., 2008). Además, hay evidencias que sugieren múltiples funciones de NURR1 en sus genes diana, dependiendo del tipo celular, el lugar de expresión, el estímulo que induce su activación y los niveles de expresión bajo cada condición (Johnson et al., 2011). Así, como resultado de estas observaciones, consideramos que la activación de la respuesta inflamatoria de NURR1 dependería del tipo celular y de la carga (dosis) de expresión en una condición determinada. En nuestro caso, la sobreexpresión de NURR1 en el endotelio cerebral induciría la activación de

la respuesta inflamatoria y la muerte celular, lo que podría provocar alteraciones en la integridad de la BHE y la unidad neurovascular.

De hecho, a partir de los resultados obtenidos de los experimentos de silenciamiento *in vitro* demostramos que NURR1 estaba directamente implicado en la expresión de ciertas moléculas que se sabe que son moduladores de la integridad de la BHE (Figura 10), incluyendo IL-1 α , que interviene en la reestructuración de la actina, las TJ y la permeabilidad endotelial (Sarkar et al., 2008; Lie et al., 2012) y de la BHE (Michael et al., 2015), e ICAM-1, que regula la adhesión y transmigración de leucocitos a cerebro mediante su unión a integrinas leucocitarias (Romanic et al., 1997; Wong et al., 1999; Greenwood et al., 2011; Benvenuto et al., 2015). En este sentido, existen evidencias claras entre la infiltración de neutrófilos a través de la BHE y la aparición de TH (Gidday et al., 2005; Rosell et al., 2008; Gautier et al., 2009; Jickling et al., 2014). A su vez, NURR1 estimula la transcripción de *CSF2*, que entre otros miembros de la familia CSF, se ha propuesto como promotor de riesgo de hemorragia en un modelo experimental de isquemia cuando se administra r-tPA (Gautier et al., 2014). Por último, NURR1 también parece regular la expresión de la proteína NF-k-B2, que forma parte del complejo de transcripción de unión al DNA NF-k-B, involucrada en la regulación de la inflamación mediante la activación de la expresión de genes considerados marcadores inflamatorios. Entre otros, los miembros de la familia NF-k-B, inducen la expresión de citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF- α durante condiciones de hipoxia (Sarada et al., 2008; Chen et al., 2015), que contribuyen al incremento de permeabilidad vascular, formación de edema y infiltración de neutrófilos; P-Selectina (Sarada et al., 2008; Paré et al., 2011), involucrada en el primer reconocimiento y adhesión “débil” leucocito-endotelio en la BHE, el cual se ha asociado a la disfunción de la BHE (Jin et al., 2010); moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (Collins et al., 1995; Sarada et al., 2008); y MMP9, implicada en la degradación de la lámina basal e incremento de permeabilidad de la BHE con la subsecuente diapédesis leucocitaria (Justicia et al., 2003; Rosell et al., 2006; Gidday et al., 2005; Gautier et al., 2009; Chen et al., 2015).

Por tanto, y a falta de confirmar esta hipótesis, inhibiendo la activación de la vía de señalización NF-k-B mediante el silenciamiento de NURR1 de manera indirecta se podría modular la expresión de moléculas inflamatorias a nivel endotelial que estarían implicadas en la activación, adhesión y transmigración leucocitaria en el endotelio. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que inhibiendo la sobreexpresión de NURR1, inducida por el r-tPA en el ictus isquémico, podríamos mantener la integridad de la BHE, evitando la activación de vías de muerte celular y la cascada inflamatoria, evitando complicaciones hemorrágicas asociadas al tratamiento.

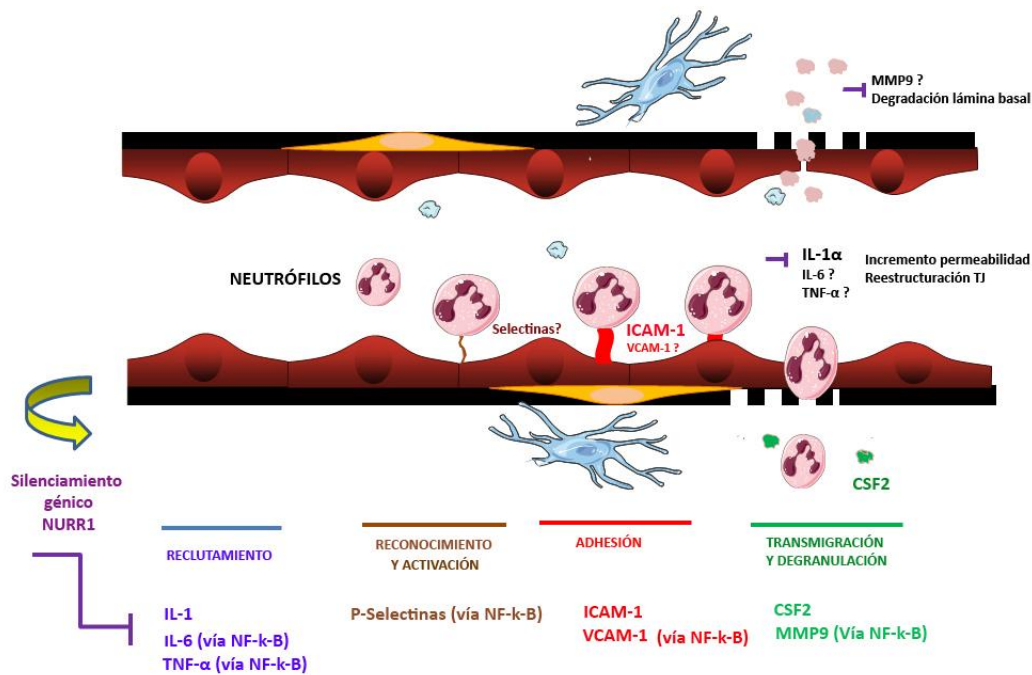


Figura 10. Posibles mecanismos moleculares por los cuáles NURR1 regularía la trans migración e infiltración de neutrófilos a través de la BHE. El silenciamiento génico de NURR1 inhibe la sobreexpresión de las moléculas inflamatorias ICAM-1, CSF2, IL1- α y NF- κ B2, relacionados con la integridad de la BHE y migración transendotelial de leucocitos relacionada con la aparición de TH. A su vez, inhibiendo la expresión del factor de transcripción NF- κ B2 mediante el silenciamiento de NURR1 se podría modular indirectamente la expresión de citoquinas que intervienen en la permeabilidad de la BHE, reclutamiento leucocitario y moléculas de adhesión leucocito-endotelio (IL-1, IL-6, MMP-9, P-Selectinas, ICAM-1 y VCAM-1).

3.4 Utilidad clínica de la determinación de NURR1 como biomarcador pronóstico de complicaciones hemorrágicas

Para confirmar nuestra hipótesis, nos propusimos estudiar NURR1 como marcador de daño en pacientes con ictus isquémico que habían recibido tratamiento trombolítico. Concretamente, quisimos comprobar si existía una asociación entre los niveles plasmáticos de NURR1 y la aparición de complicaciones hemorrágicas tras la trombolisis.

En la última parte de este estudio, se determinaron los niveles séricos de NURR1 en pacientes en fase aguda del ictus isquémico a diferentes tiempos: basal (antes de recibir el tratamiento trombolítico), 1h tras la administración de r-tPA intravenoso, 12h y 24h tras el inicio de los síntomas. Nuestros resultados mostraron que los pacientes que posteriormente sufrían una TH sintomática, presentaban unos niveles basales de NURR1 más altos que los pacientes con una TH asintomática o sin complicaciones hemorrágicas tras el tratamiento y respecto a controles.

La elaboración de curvas ROC nos permitió determinar que los niveles basales de NURR1 se asociarían a la aparición de TH sintomática con una sensibilidad del 83.3% y especificidad del 81.7%. Además, las diferencias en los niveles de NURR1 entre pacientes con una posterior TH sintomática en comparación al resto de grupos eran aún más significativas cuando se determinaban los niveles de la proteína en muestras obtenidas transcurrida una hora de la administración de r-tPA. Después de 12 y 24 h del inicio de los síntomas, los niveles de NURR1 disminuían independientemente del tipo de TH. Por tanto, nuestros resultados muestran una asociación entre los niveles periféricos de NURR1 y la aparición de complicaciones hemorrágicas en pacientes que han sufrido un ictus isquémico y han recibido tratamiento trombolítico. En este sentido, proponemos que NURR1 actuaría como un factor de transcripción temprano activado por r-tPA, que rápidamente induciría la activación de la cascada inflamatoria induciendo una disfunción endotelial.

En referencia a la fuente de la proteína NURR1 en suero, especulamos que podría ser de origen endotelial, siendo un marcador de daño celular y de integridad de la BHE (gravemente comprometida). Pero, dado que otra de las principales fuentes de Nurr1 son los linfocitos T, creemos que la sobreexpresión de NURR1 regulada por r-tPA podría ser también una respuesta sistémica, de manera similar a la respuesta que se da en pacientes con esclerosis múltiple (Doi et al. , 2008).

Una gran limitación de nuestro estudio es el pequeño tamaño de la cohorte analizada y el número limitado de pacientes con aparición de TH sintomática. Por ello, consideramos que el valor pronóstico de transformación hemorrágica que pueda aportar la determinación de NURR1 en suero debería ser confirmado en un nuevo estudio prospectivo y multicéntrico. Además, pensamos que sería muy interesante analizar el valor pronóstico de este biomarcador en combinación con otros descritos previamente en nuestro laboratorio, como son la MMP9, VAP-1 o la proteína APC.

4. Rol de las Apolipoproteínas en el tráfico de A β a través de la BHE

4.1 Modelaje de la BHE in vitro: una herramienta preclínica para el estudio de AAC y la EA.

Mientras que en el artículo 2 se utilizó una línea celular endotelial humana para determinar los cambios fisiopatológicos, en el artículo 3 se puso a punto un modelo murino de BHE *in*

vitro a partir de cultivos primarios. Durante los últimos años, muchos de los estudios funcionales en el campo de la β -amiloidosis cerebral se han basado en el transporte del péptido A β tanto *in vitro* como *in vivo*. En este sentido, en el tercer trabajo de esta tesis, quisimos establecer en nuestro laboratorio un modelo de BHE *in vitro* murino primario, diseñado y caracterizado por el grupo liderado por el Dr. Cecchelli (Cosine et al., 2006; Cecchelli et al., 2007; Mysiorek et al., 2009), para el estudio del tráfico del péptido A β . El principal objetivo de este modelo es mimetizar las características de la BHE *in vivo*, para desarrollar una herramienta preclínica y evaluar el transporte del péptido A β y el impacto de algunas moléculas relevantes descritas hasta la fecha en el campo de la AAC y la EA. Como ya hemos descrito, la importancia de la BHE se basa en la regulación de la permeabilidad de los microvasos de cerebro, y por tanto, el transporte restrictivo de sustancias. Hasta la fecha, muchos autores han comparado y cuestionado el origen de los cultivos utilizados para establecer un modelo *in vitro* de BHE que mimetice la situación en humanos. Durante años, el modelo más utilizado ha sido el bovino, el de rata y posteriormente el de ratón. Este último ha adquirido un gran interés ya que permite el uso de ratones transgénicos para estudios dirigidos a moléculas específicas (Mysiorek et al., 2009). Recientemente, se ha puesto de manifiesto las diferencias génicas entre estas especies y el humano, y es por ello por lo que muchos investigadores han puesto mucho interés en el desarrollo de modelos de BHE *in vitro* humanos. Éstos se han establecido mediante el cultivo primario de células endoteliales aisladas de tejidos frescos obtenidos por autopsia, o por biopsias de pacientes con tumores o pacientes epilépticos. A pesar de los buenos resultados, existe la limitación de la disponibilidad del material de partida y por ello no se ha podido establecer como modelo de uso universal (Cecchelli et al., 2007). Como alternativa, hay otros estudios que utilizan líneas celulares humanas inmortalizadas, como las células hCMEC/D3. Sin embargo, la inmortalización de estas células da lugar a diferencias en las propiedades específicas de BHE, como una baja resistencia eléctrica (TEER) basal y diferencias en la discontinuidad y nivel expresión de proteínas TJ (Weksler et al., 2005; Eigenmann et al., 2013), lo que se traduce en un aumento de permeabilidad y transporte de pequeñas sustancias en este modelo. Por otro lado, cabe destacar el reciente desarrollo de un modelo de BHE basado en células endoteliales a partir de la diferenciación de células madre (Man et al., 2008; Lipmann et al., 2012; Cecchelli et al., 2014), aunque las estrategias para la diferenciación en células endoteliales de BHE aún son objetivo de estudio.

Teniendo en cuenta las ventajas/desventajas y las dificultades del uso del modelo de BHE *in vitro* humano, nuestra elección fue la puesta a punto de un modelo murino. A pesar de ser

conscientes de las diferencias génicas y biológicas entre ratón y humano, creemos que el modelo primario de ratón mantiene las propiedades de BHE (especificidad del paso de sustancias y baja permeabilidad), tiene bajo coste, y, es fácil de diseñar y manipular. A diferencia de otros modelos de BHE como el bovino, el tiempo de cultivo desde el aislamiento endotelial hasta su confluencia para el uso son sólo 5 días, lo que permite que las células mantengan su fenotipo real sin la necesidad de co-cultivar el endotelio con astrocitos o medios condicionados.

Para su puesta a punto, el primer objetivo del artículo 3 fue validar el modelo murino de BHE previamente establecido (Coisne et al., 2005) para evaluar la eliminación de A β (1-40) cerebral utilizando un método de determinación fluorimétrica (Zlokovic, 2004; Saint-Pol et al., 2012; Saint-Pol et al., 2013; Bachmeier et al., 2010; Bachmerier et al., 2013). Nuestro modelo refleja el fenotipo propio de BHE, con una expresión continua del marcador endotelial CD31, de la proteína TJ ZO-1 y una baja permeabilidad paracelular. Utilizamos diferentes dosis no tóxicas de A β (1-40) fluorescente (de 1-120 nM), para evaluar la cinética de transporte de cerebro a sangre (eflujo) mediado por receptor. Además, utilizamos paralelamente Inulina marcada radioactivamente, debido a que es una molécula de igual tamaño que el péptido soluble A β (1-40) y nos sirve de control negativo de transcitosis no mediada por receptor. Además, para caracterizar nuestro modelo, confirmamos que la eliminación de A β (1-40) del compartimento basolateral al apical era principalmente vía LRP, como previamente se había descrito (Deane et al., 2004; Bell et al., 2007; Zlokovic et al., 2004). A nivel de expresión, verificamos que nuestras células endoteliales expresaban el receptor LRP1 y LRP2, dado que en el modelo bovino de BHE extensamente utilizado se ha observado recientemente la ausencia de su expresión endotelial (Candela et al., 2015). A nivel funcional, tras bloquear los receptores LRP1/2 con RAP, obtuvimos una clara reducción en la movilización de A β (1-40), por lo que pudimos concluir que la eliminación cerebral β -amiloide se producía principalmente vía LRP.

En resumen, consideramos que el modelaje *in vitro* de la BHE nos permite hacer predicciones funcionales y de transporte para moléculas implicadas en la fisiopatología del ictus, tanto isquémico como hemorrágico. En el caso específico de la AAC y la EA, el marcaje y cuantificación de A β mediante fluorescencia da lugar a un método rápido, económico y eficaz para evaluar su paso a través de la BHE.

4.2 Apo1 y ApoJ, ¿proteínas moduladoras de la acumulación de A β ?

La clara asociación entre la ApoE en la EA (Schmechel et al., 1993; Lambert et al., 2013; Michaelson, 2014) y la AAC (Greenberg et al., 1996; Nicoll et al., 1996; Greenberg et al., 1998;

Rannikmäe et al., 2014) ha despertado un gran interés en la investigación de la participación de diferentes apolipoproteínas en procesos de acumulación y eliminación de A β a nivel cerebral. Este es el caso de la ApoA1 y ApoJ, componentes importantes del metabolismo de los lípidos que pueden actuar también como chaperones naturales de péptidos A β . ApoJ forma complejos con A β (Ghiso et al., 1993; Matsubara et al., 1995) y se cree que es una de las principales proteínas transportadoras que modula su eliminación cerebral (Calero et al., 2000; Bell et al., 2007). En el caso de ApoA1, se ha encontrado unido a A β tanto en plasma como en LCR en humanos (Golabek et al., 1995; Koudinov et al., 1998) y se ha demostrado su capacidad de unión a A β , así como la modulación a la agregación de A β *in vitro* (Koldamova et al., 2001; Paula-Lima et al., 2009), pero se desconoce si también tendría un papel en su transporte a nivel cerebral. Por otra parte, dado que nuestro grupo ha observado un aumento de ApoJ plasmática en enfermos de AAC en comparación a pacientes con EA o controles, así como una correlación entre los niveles de ApoA1 y A β 40 en los casos de AAC (Montañola et al., 2015), tuvimos interés en indagar el papel que podrían tener estas apolipoproteínas en la modulación del transporte amiloide a través de la BHE.

Con este propósito, en primer lugar, produjimos y purificamos ApoA1 y ApoJ humanas recombinantes y comprobamos su funcionalidad. Mediante el ensayo de unión de Tioflavina T, pudimos comprobar que las apolipoproteínas recombinantes eran capaces de unirse al péptido A β (tanto al segmento 40 y como al 42) y evitar su agregación *in vitro*, de una manera dosis dependiente. Por otro lado, determinamos que ambas proteínas eran capaces de ser transportadas bidireccionalmente a través de la BHE utilizando nuestro modelo. En el caso de la entrada a cerebro de estas lipoproteínas, pudimos comprobar que se producía principalmente por vía LRP, ya que su bloqueo mediante RAP disminuía el transporte de ambas proteínas. Además, observamos que este transporte direccional (entrada) se incrementaba con la presencia de A β (1-40) en el compartimento opuesto, correspondiente a cerebro. Este resultado sugiere que bajo condiciones de β -amiloidosis cerebral, habría un incremento en la entrada de ApoA1 y ApoJ a cerebro, atraídas por el péptido A β .

A continuación, confirmamos que tanto la ApoA1 como la ApoJ eran capaces de modular la eliminación de A β cerebral a través de la BHE *in vitro*, aunque de manera muy diferente. Nuestro estudio, en primer lugar, permitió confirmar que ApoJ recombinante unida a A β (1-40) incrementaba el flujo del péptido A β del compartimento basolateral al apical. Como ya hemos comentado, la eliminación del péptido A β soluble a través de la BHE se produce principalmente mediante los receptores endoteliales LRP1 (Zlokovic et al., 2010) y LRP2 si está unido a ApoJ en forma de complejo ApoJ-A β (Bell et al., 2007; Marzolo et al., 2011; Stanimirovic y Friedman, 2012;). Debido a que la expresión de LRP1 (el receptor principal implicado en la eliminación de A β) se reduce en los pacientes de EA o en el proceso de envejecimiento normal (Jeynes et al., 2008; Silverberg et al., 2010), ApoJ podría ser considerado como modulador de A β cerebral utilizando rutas alternativas a LRP1, como LRP2, para su eliminación cerebral (Figura 11).

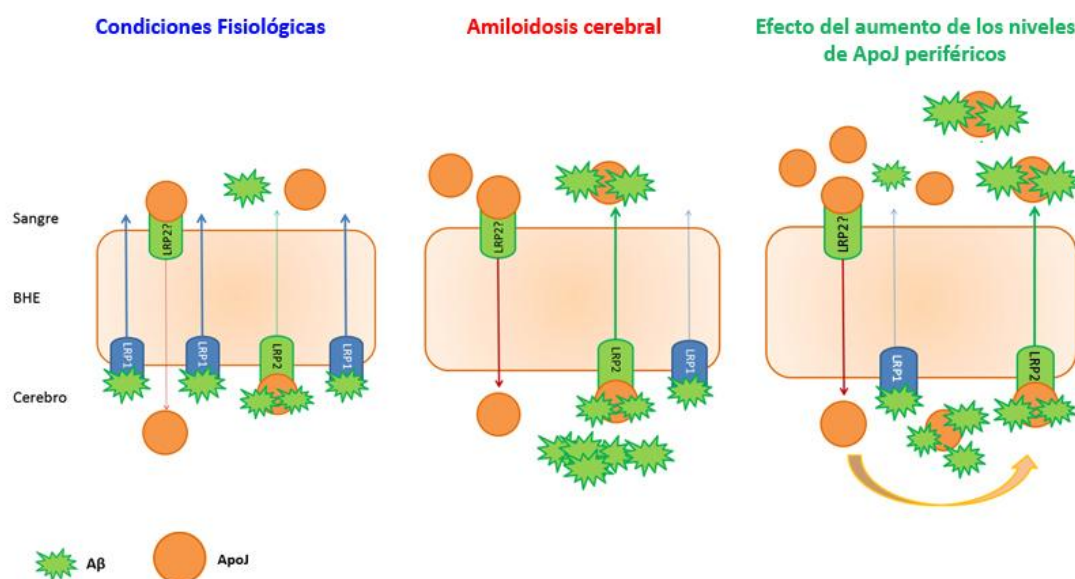


Figura 11. Hipótesis sobre el efecto de la ApoJ en la agregación y en la eliminación del péptido A β en condiciones de β -beta-amiloidosis cerebral. A la izquierda, se representa el transporte de A β en condiciones fisiológicas, principalmente por vía LRP1. En el centro, las condiciones patológicas dónde hay un acúmulo de A β cerebral y los procesos asociados, como la reducción de la expresión de LRP1 lo que daría lugar a una reducción en la eliminación del péptido A β y con la consecuente agregación de éste, y un incremento en los niveles periféricos y cerebrales de ApoJ, y salida del péptido amiloide vía LRP2 en forma de complejo con ApoJ (ApoJ-A β). A la derecha, el posible efecto del aumento de los niveles de ApoJ periféricos como terapia en esta patología, que incrementaría la entrada de ApoJ en cerebro para, a su vez, aumentar su posible eliminación en forma de complejo con A β (ApoJ-A β) vía LRP, como mecanismo para reducir los niveles de A β cerebral.

Si además tenemos en cuenta que los casos de EA esporádico presentan niveles plasmáticos de ApoJ más elevados y que se relacionan con la severidad de la enfermedad (Schrijvers et al., 2011), sugerimos que este incremento podría ser una respuesta adaptativa del organismo ante

la acumulación anómala de A β en cerebro. Por todo ello, dado que ApoJ puede unirse a A β y bloquear su agregación, junto con su capacidad de cruzar la BHE, especialmente cuando hay un acumulo de A β en cerebro, pensamos que un aumento de ApoJ a nivel periférico incrementaría el drenaje de A β cerebral y sería una posible estrategia terapéutica para estimular la eliminación de A β a través de la BHE (Figura 11).

Por mecanismos totalmente distintos a ApoJ, en nuestro modelo *in vitro*, observamos que la salida de A β cerebral estaba condicionada por los niveles de ApoA1 en el compartimento apical (sangre). Así, en presencia de ApoA1 en el compartimento apical (sangre), observamos un incremento en la salida de A β (1-40) del compartimento basolateral al apical (de cerebro a sangre). Por ello, nuestra investigación sugiere que ApoA1 en plasma podría incrementar la eliminación de A β 40 cerebral. A nivel clínico, algunos estudios han mostrado una disminución de los niveles de ApoA1 plasmáticos en la EA (Kawano et al., 1995; Saczynski et al., 2007) y que esta disminución se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Merched et al., 2000). A partir de nuestros resultados podríamos considerar que ApoA1 a nivel periférico podría actuar como secuestrador de A β cerebral, tal y como se ha propuesto para diferentes moléculas y anticuerpos siguiendo un mecanismo de arrastre periférico (teoría “*peripheral sink*”) (Yamada et al., 2010). Este factor podría contribuir a la acumulación de A β cerebral en pacientes con EA, cuyos valores de ApoA1 son más bajos respecto la población control. Por otro lado, también podemos especular que los niveles de ApoA1 en plasma estarían reducidos en pacientes con EA como consecuencia de su entrada a cerebro atraída por la acumulación de amiloide cerebral. Al unirse al péptido amiloide, ApoA1 quedaría retenida en cerebro, tal y como observamos en nuestro estudio al mostrar una reducción del tráfico de ApoA1 del compartimento basolateral al apical cuando la apolipoproteína está unida a A β (1-40). De hecho, algunos estudios puntuales han descrito que ApoA1 se encuentra asociada a las placas seniles en EA (Wisniewski et al., 1995; Harr et al., 1996).

Por último, también se han descrito propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes de las partículas HDL formadas por ApoA1 (Barter et al., 2004) y que éstas reducen transitoriamente los niveles solubles de A β cerebral en un modelo experimental de EA (Robert et al., 2015). Así pues, todo en conjunto parece indicar que un aumento periférico de ApoA1 podría reducir la carga del A β vascular y la inflamación asociada con su deposición. Por ello, sugerimos que la administración periférica de ApoA1 podría inducir efectos protectores en modelos de β -amiloidosis cerebral, promoviendo así la eliminación de A β soluble y previniendo los efectos deletéreos de su acumulación, como son la inflamación y la neurodegeneración (Figura 12).

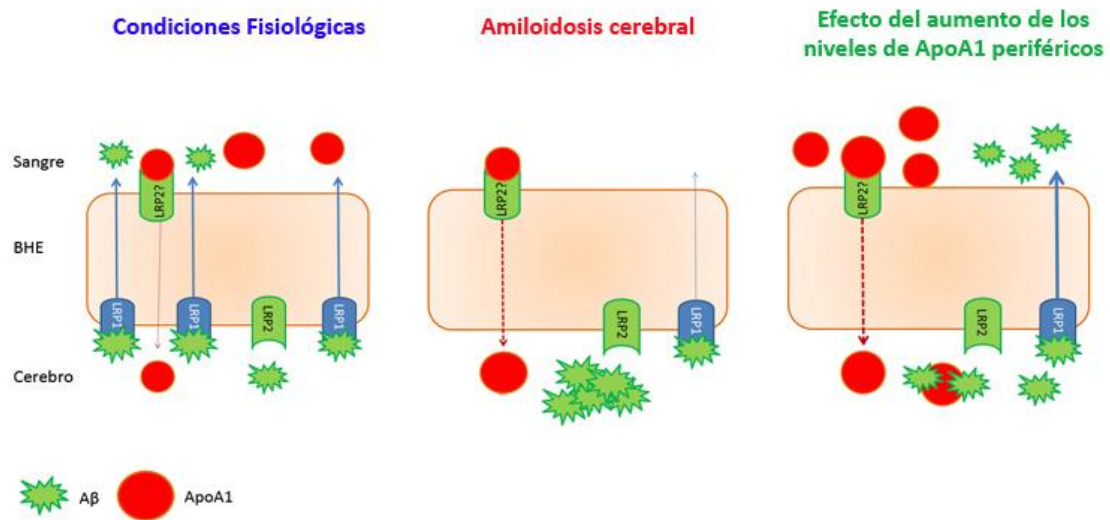
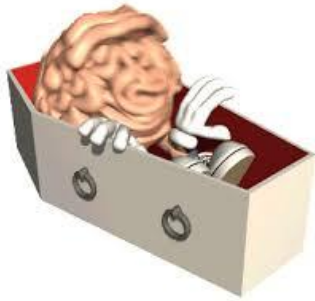


Figura 12. Hipótesis sobre el efecto de la administración intravenosa de ApoA1 en la β -amiloidosis cerebral. A la izquierda, se representa el transporte de A β en condiciones fisiológicas, principalmente por vía LRP1. En el centro, onde hay un acúmulo de A β cerebral y los procesos asociados, como una reducción de los niveles de ApoA1 periféricos y una reducción de la expresión de LRP1, lo que daría lugar a una reducción en la eliminación del péptido A β a través de la BHE. A la derecha, el posible efecto del aumento de los niveles de ApoA1 periféricos como terapia en esta patología, que estimularía la salida de A β cerebral mediante un mecanismo de arrastre periférico por parte de ApoA1 plasmática (teoría "peripheral sink").

En resumen, el conjunto de nuestros resultados sugiere que los niveles y la localización tanto de ApoJ como ApoA1 pueden modular el transporte de A β (1-40) a través de la BHE. Por tanto, consideramos que ApoJ y ApoA1 ofrecen un gran valor terapéutico en la AAC y en la EA pudiendo modular la acumulación y la eliminación de A β cerebral.

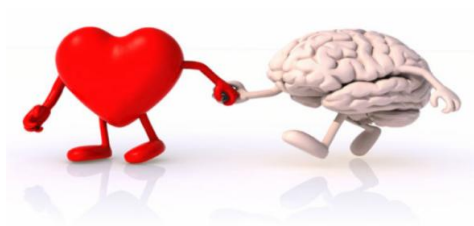


Conclusiones

Conclusiones

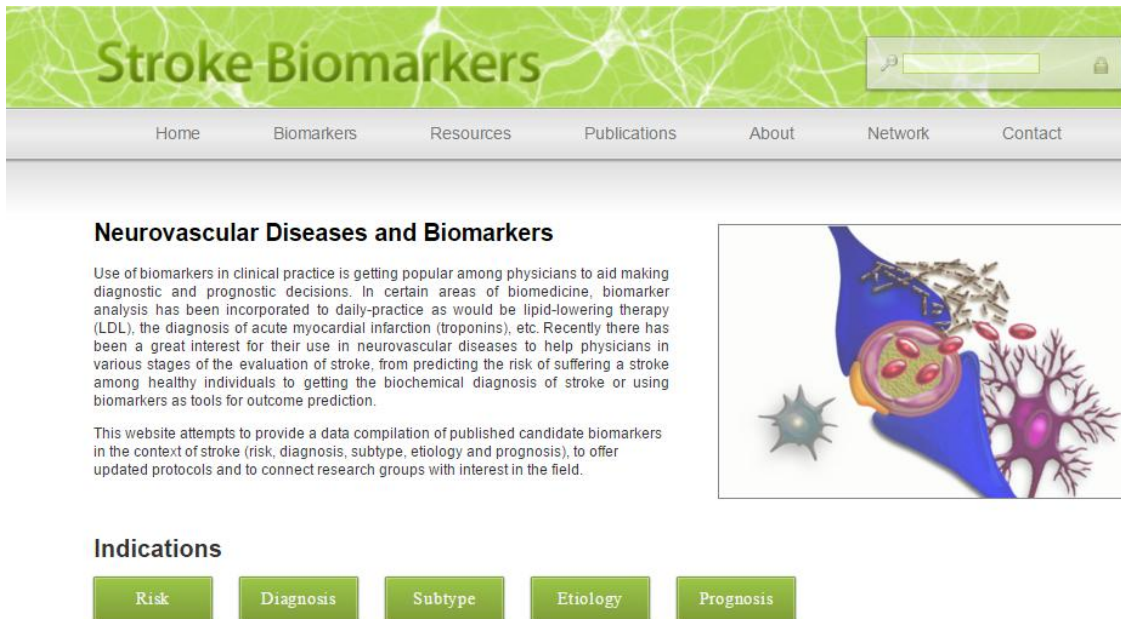
Las principales conclusiones de esta tesis son las siguientes:

- A partir de la bibliografía publicada, consideramos que la determinación en sangre de las proteínas GFAP, S100B y/o RAGE permitiría diferenciar el ictus isquémico del ictus hemorrágico. Hasta la fecha, no se ha descrito ningún biomarcador que clasifique la etiología del ictus hemorrágico.
- Mediante el *screening* transcriptómico masivo llevado a cabo por la tecnología de microarrays, nuestro primer estudio no ha permitido identificar biomarcadores plasmáticos que sean capaces de diferenciar la etiología de la HIC primaria. Aun así, hemos encontrado indicios de que la expresión en leucocitos del transcrito y de la proteína GOLGA8A están aumentados en la fase crónica de la HIC, aunque desconocemos los mecanismos patológicos en los cuales estaría implicada dicha proteína.
- En un segundo estudio, hemos demostrado que la sobreexpresión de NURR1 inducida por r-tPA durante la isquemia está asociada a la disfunción endotelial y a un incremento de la respuesta inflamatoria. Además, hemos reportado que la determinación de los niveles séricos de NURR1 en pacientes con ictus isquémico antes de recibir el tratamiento trombolítico podrían predecir el riesgo de sufrir una transformación hemorrágica inducida por la trombolisis.
- Por último, hemos confirmado que el modelo murino de BHE *in vitro* utilizado en el tercer trabajo es una herramienta útil para el estudio del transporte del péptido A β . En este sentido, hemos demostrado que la presencia y localización de las apolipoproteínas ApoJ y ApoA1 recombinantes humanas modulan la eliminación de A β (1-40) a través de la BHE, pudiendo ser consideradas como dianas para nuevas estrategias terapéuticas en el contexto de la AAC.



Anexo

Página de Inicio de la WebSite Stroke-Biomarkers (www.stroke-biomarkers.com). Esta web ha sido construída en el Laboratorio de Investigación Neurovascular (LIN) y tiene como objetivo recoger todos los estudios relacionados con la identificación de biomarcadores en el ictus. Los biomarcadores pueden ser de utilidad diagnóstica, pronóstica, para clasificar su etiología, de riesgo o diferenciar el subtipo de ictus (isquémico o hemorrágico).



The screenshot shows the homepage of the Stroke Biomarkers website. The header features the title "Stroke Biomarkers" in a green font on a light green background with a network diagram. Below the header is a navigation menu with links for Home, Biomarkers, Resources, Publications, About, Network, and Contact. The main content area is titled "Neurovascular Diseases and Biomarkers" and contains two paragraphs of text. To the right of the text is an illustration of a brain with a cross-section showing a blood vessel and a neuron. Below the text is a section titled "Indications" with five green buttons labeled Risk, Diagnosis, Subtype, Etiology, and Prognosis.

Stroke Biomarkers

Home Biomarkers Resources Publications About Network Contact

Neurovascular Diseases and Biomarkers

Use of biomarkers in clinical practice is getting popular among physicians to aid making diagnostic and prognostic decisions. In certain areas of biomedicine, biomarker analysis has been incorporated to daily-practice as would be lipid-lowering therapy (LDL), the diagnosis of acute myocardial infarction (troponins), etc. Recently there has been a great interest for their use in neurovascular diseases to help physicians in various stages of the evaluation of stroke, from predicting the risk of suffering a stroke among healthy individuals to getting the biochemical diagnosis of stroke or using biomarkers as tools for outcome prediction.

This website attempts to provide a data compilation of published candidate biomarkers in the context of stroke (risk, diagnosis, subtype, etiology and prognosis), to offer updated protocols and to connect research groups with interest in the field.

Indications

Risk Diagnosis Subtype Etiology Prognosis

Carrera investigadora de la doctoranda

Publicaciones

-**Merino-Zamorano C**, Fernández-de Retana C, Montañola A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, Gosselet F, Montaner J, Hernández-Guillamon M. Modulation of beta-amyloid (1-40) transport by ApoA1 and ApoJ across an in vitro model of the blood-brain barrier (submitted in Journal of Alzheimer's Disease, under review).

-Montañola A, de Retana SF, López-Rueda A, **Merino-Zamorano C**, Penalba A, Fernández-Álvarez P, Rodríguez-Luna D, Malagelada A, Pujadas F, Montaner J, Hernández-Guillamon M. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med* 2015 Dec 14

-**Merino-Zamorano C**, Delgado P, Fernández de Retana S, Fernández-Cadenas I, Rodríguez-Luna D, Montaner J, Hernández-Guillamon M. Identification of Plasma Biomarkers of Human Intracerebral Hemorrhage Subtypes through Microarray Technology. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015a Dec 29.

-**Merino-Zamorano C**, Hernández-Guillamon M, Jullienne A, Le Béhot A, Bardou I, Parés M, Fernández-Cadenas I, Giralt D, Carrera C, Ribó M, Vivien D, Ali C, Rosell A, Montaner J. NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic stroke. *Stroke*. 2015b;46(2):477-84.

-Hernández-Guillamon M, Ortega L, **Merino-Zamorano C**, Campos-Martorell M, Rosell A, Montaner J. Mild hypothermia protects against oxygen glucose deprivation (OGD)-induced cell death in brain slices from adult mice. *J Neural Transm*. 2014; 121(2):113-7.

-Malhotra S, Castilló J, Negrotto L, **Merino-Zamorano C**, Montaner J, Vidal-Jordana A, Montalban X, Comabella M. TRPM4 mRNA expression levels in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2013; 261(1-2):146-8.

-Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, García-Berrocoso T, Giralt D, **Merino C**, Ribó M, Rosell A, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Romero F, Molina C, Alvarez-Sabín J, Hernández-Guillamon M. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics*. 2012; 75(15):4758-65.

-Delgado P, Chacón P, Penalba A, Pelegrí D, **Merino C**, Ribó M, Rubiera M, Álvarez-Sabin J, Montaner J. Temporal profile and prognostic value of Lp-PLA2 mass and activity in the acute stroke setting. *Atherosclerosis*. 2012; 220(2):532-6.

Congresos y docencia

- LXI Reunión anual de la Sociedad Española de Neurología (SEN). Barcelona, Noviembre 2012.
- Franco-Belgian-British multinational meeting on blood-brain interfaces. Arras (Francia). Mayo 2013.
- I Reunión Anual de la Red INVICTUS. Santiago de Compostela. Presentación oral del trabajo: "Implicación Nurr1 en las complicaciones hemorrágicas asociadas al tratamiento trombolítico". Junio 2014.
- 4th International CAA Conference. Londres, Reino Unido. Presentación oral: " β -amyloid(1-40) peptide and ApoA1 / ApoJ transport across a murine in vitro blood-brain barrier model". Septiembre 2014.
- 8ª Jornadas científicas del Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR). Presentación oral del trabajo: "Implicación Nurr1 en las complicaciones hemorrágicas asociadas al tratamiento trombolítico". Diciembre de 2014.
- Docencia en el Máster en Investigación Biomédica Translacional del VHIR-UAB. Presentación: "Stroke *in vitro* models". Diciembre 2014.

Cursos

- Curso de Formación para Personal Investigador Usuario de Animales Para Experimentación y Otras Finalidades Científicas. FELASA. Universidad Autónoma de Barcelona. Febrero de 2013.

Estancias

- Estancia en el laboratorio de la Universidad d'Artois, *Laboratoire Physiopathologique de la Barrière Héмато-Encéphalique* (EA 2465) Lens (Francia). Actividad desarrollada: "Puesta a punto de un modelo murino de barrera hematoencefálica *in vitro* para el estudio del transporte de A β marcado con fluroescencia". Marzo-Junio 2013.

Patentes

- Mar Hernández-Guillamón, **CRISTINA MERINO**, Anna Rosell and Joan Montaner. "Methods for determining the propensity of a patient for hemorrhagic transformation after stroke". Application number: EP13382546.3. Fundació Hospital Universitari Vall d'Hebron-Institut de Recerca.

Participación en proyectos

-Therapeutic impact of ApoJ/Clusterin-coupled liposomes on Alzheimer's disease experimental models, 40/U/2014. Marató TV3- Neurodegenerative Diseases (Televisió de Catalunya) (2015-2017). IP: Mar Hernández Guillamon.

- Marcadores radiológicos y biológicos de disfunción cerebrovascular en la Angiopatía Cerebral Amiloide. PI14/01134. Sistema Nacional de Salud, Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (2015-2017). IP: Mar Hernández Guillamon.

-Role of apolipoproteins (ApoE, ApoJ and APOA-1) in Cerebral Amyloid Angiopathy: study of β -amyloid traffic across the blood brain barrier, CP12/03259. Sistema Nacional de Salud, Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (2013-2015). IP: Mar Hernández Guillamon

-INVICTUS (Redes Temáticas RETICS, RD12/0014/0005). Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto Carlos III (2013-2016). IP: Joan Montaner

-European Stroke Research Network (EUSTROKE), 2007-2.4.2-3. European Union (FP7) (2008-2012). IP: Joan Montaner



Bibliografía

Bibliografía

A

Abbott NJ, Khan EU, Rollinson CM, Reichel A, Janigro D, Dombrowski SM, Dobbie MS, Begley DJ. Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier. *Novartis Found Symp* 2002;243:38-47; discussion 47-53, 180-5.

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7: 41–53.

Abboud H, Labreuche J, Meseguer E, Lavallee PC, Simon O, Olivot JM, Mazighi M, Dehoux M, Benessiano J, Steg PG, Amarenco P. Ischemia-modified albumin in acute stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007;23(2-3):216-20.

Abilleira, S., Montaner, J., Molina, C.A., Monasterio, J., Castillo, J., Alvarez-Sabin, J.. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J. Neurosurg* 2003; 99: 65–70.

Acar A, Cevik MU, Arıkanoglu A, Evliyaoglu O, Basarılı MK, Uzar E, Ekici F, Yucel Y, Tasdemir N. Serum levels of calcification inhibitors in patients with intracerebral hemorrhage. *Int J Neurosci* 2012;12:227-232.

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993;24(1):35-41.

Adibhatla RM, Hatcher JF. Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7(3):243-53.

Aguilar MI, Brott TG. Update in intracerebral hemorrhage. *Neurohospitalist* 2011;1(3):148-59.

Aherne CM, McMorrow J, Kane D, FitzGerald O, Mix KS, Murphy EP. Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Mol Immunol* 2009;46(16):3345-57.

Aherne CM, McMorrow J, Kane D, FitzGerald O, Mix KS, Murphy EP. Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Mol Immunol* 2009;46(16):3345-57.

Alvarez-Sabin, J., Delgado, P., Abilleira, S., Molina, C.A., Arenillas, J., Ribo, M., Santamarina, E., Quintana, M., Monasterio, J., Montaner, J. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke* 2004;35: 1316–1322.

Anderson CS, Heeley E, Huang Y, Wang J, Stapf C, Delcourt C, Lindley R, Robinson T, Lavados P, Neal B, Hata J, Arima H, Parsons M, Li Y, Wang J, Heritier S, Li Q, Woodward M, Simes RJ, Davis SM, Chalmers J. Rapid blood-pressure lowering in patients with acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2013; 368:2355-2365.

Anderson CS, Huang Y, Wang JG, Arima H, Neal B, Peng B, Heeley E, Skulina C, Parsons MW, Kim JS, Tao QL, Li YC, Jiang JD, Tai LW, Zhang JL, Xu E, Cheng Y, Heritier S, Morgenstern LB, Chalmers J. Intensive blood pressure reduction in acute cerebral haemorrhage trial (INTERACT): a randomised pilot trial. *Lancet Neurol* 2008;7:391-399.

András IE, Deli MA, Veszeka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27(8):1431-43.

Araki G, Mihara H, Mizukami M, Kin H, Nishijima M, Yoshida Y. Comparative angiographic and histological evaluations of intracranial atherosclerosis in hypertensive and normotensive subjects. *Stroke* 1978;9(4):364-8.

Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. *Acta Neuropathol* 2005;110(4):345-59.

B

Bachmeier C, Mullan M, Paris D. Characterization and use of human brain microvascular endothelial cells to examine β -amyloid exchange in the blood-brain barrier. *Cytotechnology* 2010;62:519-29.

Bachmeier C, Paris D, Beaulieu-Abdelahad D, Mouzon B, Mullan M, Crawford F. A multifaceted role for apoE in the clearance of beta-amyloid across the blood-brain barrier. *Neurodegener Dis* 2013;11(1):13-21.

Bachmeier C, Paris D, Beaulieu-Abdelahad D, Mouzon B, Mullan M, Crawford F (2013) A multifaceted role for apoE in the clearance of beta-amyloid across the blood-brain barrier. *Neurodegener Dis* 2013;11:13-21.

Bading JR, Yamada S, Mackic JB, Kirkman L, Miller C, Calero M, Ghiso J, Frangione B, Zlokovic BV. Brain clearance of Alzheimer's amyloid-beta40 in the squirrel monkey: a SPECT study in a primate model of cerebral amyloid angiopathy. *J Drug Target* 2002;10(4):359-68.

Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S, Koger D, DeLong C, Hansen JC, Sullivan PM, Paul SM. Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J Neurosci* 2009;29(21):6771-9.

Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 2008;60: 430–440.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95(8):764-72.

Becker KJ, Baxter AB, Bybee HM, Tirschwell DL, Abouelsaad T, Cohen WA. Extravasation of radiographic contrast is an independent predictor of death in primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1999;30(10):2025-32.

Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27(5):909-18.

Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2009;118(1):103-13.

Benchenane K, Berezowski V, Fernández-Monreal M, Brillault J, Valable S, Dehouck MP, Cecchelli R, Vivien D, Touzani O, Ali C. Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke* 2005;36(5):1065-70.

Benvenuto F, Voci A, Carminati E, Gualandi F, Mancardi G, Uccelli A, Vergani L. Human mesenchymal stem cells target adhesion molecules and receptors involved in T cell extravasation. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(1):245.

Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJ, van Walderveen MA, Staals J, Hofmeijer J, van Oostayen JA, Lycklama à Nijeholt GJ, Boiten J, Brouwer PA, Emmer BJ, de Bruijn SF, van Dijk LC, Kappelle LJ, Lo RH, van Dijk EJ, de Vries J, de Kort PL, van Rooij WJ, van den Berg JS, van Hasselt BA, Aerden LA, Dallinga RJ, Visser MC, Bot JC, Vroomen PC, Eshghi O, Schreuder TH, Heijboer RJ, Keizer K, Tielbeek AV, den Hertog HM, Gerrits DG, van den Berg-Vos RM, Karas GB, Steyerberg EW, Flach HZ, Marquering HA, Sprengers ME, Jenniskens SF, Beenen LF, van den Berg R, Koudstaal PJ, van Zwam WH, Roos YB, van der Lugt A, van Oostenbrugge RJ, Majoie CB, Dippel DW; MR CLEAN Investigators. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jan 1;372(1):11-20.

Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(11):876-86. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10(7):672-80.

Biffi A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: a systematic review. *J Clin Neurol* 2011;7(1):1-9.

Biomarkers definitions working Group: Biomarkers and surrogate endpoints; preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89-95.

Bonta PI, Pols TW, van Tiel CM, Vos M, Arkenbout EK, Rohlena J, Koch KT, de Maat MP, Tanck MW, de Winter RJ, Pannekoek H, Biessen EA, Bot I, de Vries CJ. Nuclear receptor Nurr1 is expressed in and is associated with human restenosis and inhibits vascular lesion formation in mice involving inhibition of smooth muscle cell proliferation and inflammation. *Circulation* 2010;121(18):2023-32.

Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, Arkenbout EK, Seppen J, Spek CA, van der Poll T, Pannekoek H, de Vries CJ. Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(10):2288-94.

Broderick J, Connolly S, Feldmann E, Hanley D, Kase C, Krieger D, Mayberg M, Morgenstern L, Ogilvy CS, Vespa P, Zuccarello M; American Heart Association; American Stroke Association

Stroke Council; High Blood Pressure Research Council; Quality of Care and Outcomes in Research Interdisciplinary Working Group. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage in adults: 2007 update: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, High Blood Pressure Research Council, and the Quality of Care and Outcomes in Research Interdisciplinary Working Group. *Stroke* 2007;38(6):2001-23.

Broderick JP, Tomsick TA, Palesch YY. Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2013;368(25):2432-3.

Brunswick AS, Hwang BY, Appelboom G, Hwang RY, Piazza MA, Connolly ES Jr. Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci* 2012;321(1-2):1-10.

Bu G, Marzolo MP. Role of rap in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(4):148-55.

Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(5):333-44.

Butcher KS, Jeerakathil T, Hill M, Demchuk AM, Dowlatshahi D, Coutts SB, Gould B, McCourt R, Asdaghi N, Findlay JM, Emery D, Shuaib A. The Intracerebral Hemorrhage Acutely Decreasing Arterial Pressure Trial. *Stroke* 2013; 44: 620-626.

C

Calero M, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J. Clusterin and Alzheimer's disease. *Subcell Biochem* 2005;38:273-98.

Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 2000;50(4):305-15.

Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney AL, Stalder M, Tolnay M, Wiederhold KH, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(24):14088-93.

Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ, Wu TY, Brooks M, Simpson MA, Miteff F, Levi CR, Krause M, Harrington TJ, Faulder KC, Steinfort BS, Priglinger M, Ang T, Scroop R, Barber PA, McGuinness B, Wijeratne T, Phan TG, Chong W, Chandra RV, Bladin CF, Badve M, Rice H, de Villiers L, Ma H, Desmond PM, Donnan GA, Davis SM; EXTEND-IA Investigators. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1009-18.

Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, Fenart L. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res*. 2015;1594:15-26.

Carmichael ST, Vespa PM, Saver JL, Coppola G, Geschwind DH, Starkman S, Miller CM, Kidwell CS, Liebeskind DS, Martin NA. Genomic profiles of damage and protection in human intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(11):1860-75.

Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J, Dávalos A. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004;35(7):1671-6.

Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003 Jan;34(1):40-6.

Castellanos M, Sobrino T, Millán M, García M, Arenillas J, Nombela F, Brea D, Perez de la Ossa N, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Dávalos A. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke*. 2007;38(6):1855-9.

Castellazzi M, Tamborino C, De Santis G, Garofano F, Lupato A, Ramponi V, Trentini A, Casetta I, Bellini T, Fainardi E. Timing of serum active MMP-9 and MMP-2 levels in acute and subacute phases after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2010;106:137-40.

Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, Coisne C, Engelhardt B, Dehouck MP, Ferreira L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* 2014;9(6):e99733.

Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(8):650-61.

Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buée-Scherrer V V, Duhem C, Lundquist S, Renftel M, Torpier G, Dehouck MP. In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;36(2-3):165-178.

Chang JS, Wendt T, Qu W, Kong L, Zou YS, Schmidt AM, Yan SF. Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res* 2008;102(8):905-13.

Charidimou A, Jäger RH, Peeters A, Vandermeeren Y, Laloux P, Baron JC, Werring DJ. White matter perivascular spaces are related to cortical superficial siderosis in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 2014;45(10):2930-5.

Charnay Y, Imhof A, Vallet PG, Hakkoum D, Lathuiliere A, Poku N, Aronow B, Kovari E, Bouras C, Giannakopoulos P. Clusterin expression during fetal and postnatal CNS development in mouse *Neuroscience* 2008;155(3):714-24

Chen S, Yang Q, Chen G, Zhang JH. An update on inflammation in the acute phase of intracerebral hemorrhage. *Transl Stroke Res* 2015;6(1):4-8.

Chevilly A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D. Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front Cell Neurosci* 2015;9:415.

Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease.

Coisne C, Faveeuw C, Delplace Y, Dehouck L, Miller F, Cecchelli R, Dehouck B. Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells in vitro in response to distinct inflammatory stimuli. *Neurosci Lett* 2006;392(3):216-20.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9(10):899-909.

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 1994;7(2):180-4. *Ann Neurol*. 1996 May;39(5):682-3.

Counsell C, Boonyakarnkul S, Dennis M, Sandercock P, Bamford J, Burn J, Warlow C. Primary intracerebral haemorrhage in the Oxfordshire community stroke project, 2: prognosis. *Cerebrovasc Dis* 1995;5:26–34.

Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamón M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A, Montaner J. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* 2008;84(1):207-14.

D

Dávalos A, Pereira VM, Chapot R, Bonafé A, Andersson T, Gralla J; Solitaire Group; Retrospective multicenter study of Solitaire FR for revascularization in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 2012;43(10):2699-705.

Davis SM, Broderick J, Hennerici M, Brun NC, Diringer MN, Mayer SA, Begtrup K, Steiner T. Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2006;66:1175-1181.

Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 2003;9(7):907-13.

Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV. ApoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 2008;118(12):4002-13.

Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 2004;43(3):333-44.

Delgado P, Cuadrado E, Rosell A, Alvarez-Sabín J, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamón M, Penalba A, Molina CA, Montaner J. Fas system activation in perihematomal areas after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2008;39:1730-1734.

DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Harmony JA, Aronow BJ, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels

and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo *Neuron* 2004;41(2):193-202

DeMattos RB, O'dell MA, Parsadanian M, Taylor JW, Harmony JA, Bales KR, Paul SM, Aronow BJ, Holtzman DM Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10843-8

Dereix L, Nighoghossian N. Intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: an update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(10):1093-9.

Díaz-Guzmán J, Egido JA, Gabriel-Sánchez R, Barberá-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernández-Pérez C; IBERICTUS Study Investigators of the Stroke Project of the Spanish Cerebrovascular Diseases Study Group. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. *Cerebrovasc Dis* 2012;34(4):272-81.

Dickstein DL, Biron KE, Ujiie M, Pfeifer CG, Jeffries AR, Jefferies WA. Abeta peptide immunization restores blood-brain barrier integrity in Alzheimer disease. *FASEB J* 2006;20(3):426-33.

Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T. Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(24):8381-6.

Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA 3rd, Silverberg GD, Miller MC, Tavares R, Yang W, Wu Q, Sabo E, Hovanesian V, Stopa EG. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2006;112(4):405-15.

Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med* 2007;7(8):711-24.

Dong XQ, Huang M, Hu YY, Yu WH, Zhang ZY. Time course of plasma leptin concentrations after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *World Neurosurg* 2010;74:286-293.

Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 2008;14(16):1581-1593.

Dvorak F, Haberer I, Sitzer M, Foerch C. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(1):37-41.

Dykstra-Aiello C, Jickling GC, Ander BP, Zhan X, Liu D, Hull H, Orantia M, Ho C, Stamova B. Intracerebral Hemorrhage and Ischemic Stroke of Different Etiologies Have Distinct Alternatively Spliced mRNA Profiles in the Blood: a Pilot RNA-seq Study. *Transl Stroke Res.* 2015;6(4):284-9.

E

Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 2003;5(5):486-8.

Eigenmann DE1, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS* 2013;10(1):33.

Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly D, Heyman A. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology* 1996;46(6):1592-6.

Engelhardt B & Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 2009;31(4):497-511.

Erdö F, Trapp T, Mies G, Hossmann KA. Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Acta Neuropathol.* 2004;107(2):127-36.

F

Fagan AM, Christopher E, Taylor JW, Parsadanian M, Spinner M, Watson M, Fryer JD, Wahrle S, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM. ApoA1 deficiency results in marked reductions in plasma cholesterol but no alterations in amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis. *Am J Pathol* 2004;165(4):1413-22.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):4162-7.

Fernandez-Cadenas I, Del Rio-Espinola A, Domingues-Montanari S, Mendioroz M, Fernandez-Morales J, Penalba A, Rubiera M, Hernandez-Guillamon M, Rosell A, Delgado P, Chacon P, Ribo M, Alvarez-Sabin J, Molina CA, García-Arumi E, Montaner J. Genes involved in hemorrhagic transformations that follow recombinant t-PA treatment in stroke patients. *Pharmacogenomics* 2013;14(5):495-504.

Fiebach JB, Schellinger PD, Gass A, Kucinski T, Siebler M, Villringer A, Olkers P, Hirsch JG, Heiland S, Wilde P, Jansen O, Röther J, Hacke W, Sartor K; Kompetenznetzwerk Schlaganfall B. Stroke magnetic resonance imaging is accurate in hyperacute intracerebral hemorrhage: a multicenter study on the validity of stroke imaging. *Stroke* 2004;35(2):502-6.

Fiorelli M, Bastianello S, von Kummer R, del Zoppo GJ, Larrue V, Lesaffre E, Ringleb AP, Lorenzano S, Manelfe C, Bozzao L. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke* 1999;30(11):2280-4.

Fisher CK, Ullman O, Stultz CM. Comparative studies of disordered proteins with similar sequences: application to A β 40 and A β 42. *Biophys J* 2013;104(7):1546-55.

Fisher CM. Pathological observations in hypertensive cerebral haemorrhage. *J Neuropathol Exper Neurol* 1971;30:536-550.

Foerch C, Niessner M, Back T, Bauerle M, De Marchis GM, Ferbert A, Grehl H, Hamann GF, Jacobs A, Kastrup A, Klimpe S, Palm F, Thomalla G, Worthmann H, Sitzer M; BE FAST Study Group. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin Chem* 2012;58(1):237-45.

Foerch C, Wunderlich MT, Dvorak F, Humpich M, Kahles T, Goertler M, Alvarez-Sabín J, Wallesch CW, Molina CA, Steinmetz H, Sitzer M, Montaner J. Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke* 2007;38(9):2491-5.

Fogelholm R, Murros K, Rissanen A, Avikainen S. Long term survival after primary intracerebral haemorrhage: a retrospective population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76(11):1534-8.

Frank RN, Dutta S, Mancini MA. Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1086–1091.

Fryer JD, Demattos RB, McCormick LM, O'Dell MA, Spinner ML, Bales KR, Paul SM, Sullivan PM, Parsadanian M, Bu G, Holtzman DM. The low density lipoprotein receptor regulates the level of central nervous system human and murine apolipoprotein E but does not modify amyloid plaque pathology in PDAPP mice. *J Biol Chem* 2005;280(27):25754-9.

Fryer JD, Taylor JW, DeMattos RB, Bales KR, Paul SM, Parsadanian M, Holtzman DM. Apolipoprotein E markedly facilitates age-dependent cerebral amyloid angiopathy and spontaneous hemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 2003;23(21):7889-96.

G

Gautier S, Ouk T, Petrault O, Caron J, Bordet R. Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* 2009;156(4):673-9.

Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura N H, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B. The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex *Biochemical Journal* 1993;293(Pt1):27-30.

Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(2):H558-68.

Giri R, Shen Y, Stins M, Du Yan S, Schmidt AM, Stern D, Kim KS, Zlokovic B, Kalra VK. beta-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279(6):C1772-81.

Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* 2009;29(34):10582-7.

Godoy DA, Piñero GR, Koller , Masotti L1, Di Napoli M. Steps to consider in the approach and management of critically ill patient with spontaneous intracerebral hemorrhage. *World J Crit Care Med* 2015;4(3):213-29.

Golabek A, Marques MA, Lalowski M, Wisniewski T. Amyloid beta binding proteins in vitro and in normal human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 1995;191(1-2):79-82.

Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 1993;13(8):3510-24.

Gosselet F, Candela P, Sevin E, Berezowski V, Cecchelli R, Fenart L. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res* 2009;1249:34-42.

Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG, Willinsky RA, Sapkota BL, Dowlatshahi D, Frei DF, Kamal NR, Montanera WJ, Poppe AY, Ryckborst KJ, Silver FL, Shuaib A, Tampieri D, Williams D, Bang OY, Baxter BW, Burns PA, Choe H, Heo JH, Holmstedt CA, Jankowitz B, Kelly M, Linares G, Mandzia JL, Shankar J, Sohn SI, Swartz RH, Barber PA, Coutts SB, Smith EE, Morrish WF, Weill A, Subramaniam S, Mitha AP, Wong JH, Lowerison MW, Sajobi TT, Hill MD; ESCAPE Trial Investigators. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1019-30.

Gravanis I, Tzirka SE. Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12(2):159-70.

Greenberg SM, Eng JA, Ning M, Smith EE, Rosand J. Hemorrhage burden predicts recurrent intracerebral hemorrhage after lobar hemorrhage. *Stroke* 2004;35:1415–1420.

Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, Koloris GJ, Kanter DS, Kase CS, Pessin MS. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 1996;27:1333-1337.

Greenberg SM, Cho HS, O'Donnell HC, Rosand J, Segal AZ, Younkin LH, Younkin SG, Rebeck GW. Plasma beta-amyloid peptide, transforming growth factor-beta 1, and risk for cerebral amyloid angiopathy. *Ann N Y Acad Sci* 2000;903:144-9.

Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy prospects for clinical diagnosis and treatment. *Ann Neurol* 1998;18:54-59.

Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37(1):24-39.

Grinberg LT, Thal DR. Vascular pathology in the aged human brain. *Acta Neuropathol* 2010;119(3):277-90.

Gu L, Guo Z. Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem* 2013;126(3):305-11.

Gunduz A, Turedi S, Mentese A, Altunayoglu V, Turan I, Karahan SC, Topbas M, Aydin M, Eraydin I, Akcan B. Ischemia-modified albumin levels in cerebrovascular accidents. *Am J Emerg Med* 2008;26(8):874-8.

Gupta VB, Laws SM, Villemagne VL, Ames D, Bush AI, Ellis KA, Lui JK, Masters C, Rowe CC, Szoek C, Taddei K, Martins RN; AIBL Research Group. Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk: the AIBL study of aging. *Neurology* 2011;76(12):1091-8.

H

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008;359:1317–1329.

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. NINDS. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 1995;274:1017–1025.

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Dávalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P. Randomised double-blind placebo-

controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 1998;352(9136):1245-51.

Hallenbeck JM. Significance of the inflammatory response in brain ischemia. *Acta Neurochir Suppl.* 1996;66:27-31.

Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 1997;272(30):18644-9.

Hanger HC, Wilkinson TJ, Fayed-Iskander N, Sainsbury R. The risk of recurrent stroke after intracerebral haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:836–840.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297(5580):353-6.

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;66(6):2429-35.

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;66(6):2429-35.

Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood–brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2003;25(1):26-39.

Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005;57(2):173-185.

Heiss WD. The concept of the penumbra: can it be translated to stroke management? *Int J Stroke* 2010;5(4):290-5.

Herisson F, Delaroche O, Auffray-Calvier E, Duport BD, Guillon B. Ischemia-modified albumin and heart fatty acid-binding protein: could early ischemic cardiac biomarkers be used in acute stroke management? *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2010;19(4):279-82.

Hernandez-Guillamon M, Delgado P, Penalba A, Rodriguez-Luna D, Molina CA, Rovira A, Alvarez-Sabin J, Boada M, Montaner J. Plasma β -amyloid levels in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Neurodegener Dis* 2012b;10:320-323.

Hernandez-Guillamon M, Solé M, Delgado P, García-Bonilla L, Giralt D, Boada C, Penalba A, García S, Flores A, Ribó M, Alvarez-Sabin J, Ortega-Aznar A, Unzeta M, Montaner J. VAP-1/SSAO plasma activity and brain expression in human hemorrhagic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2012a;33(1):55-63.

Hernandez-Guillamon M¹, Garcia-Bonilla L, Solé M, Sosti V, Parés M, Campos M, Ortega-Aznar A, Domínguez C, Rubiera M, Ribó M, Quintana M, Molina CA, Alvarez-Sabín J, Rosell A, Unzeta M, Montaner J. Plasma VAP-1/SSAO activity predicts intracranial hemorrhages and adverse neurological outcome after tissue plasminogen activator treatment in stroke. *Stroke* 2010 Jul;41(7):1528-35.

Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* 2002;71:405-34.

Herz J, Chen Y, Masiulis I, Zhou L. Expanding functions of lipoprotein receptors. *J Lipid Res* 2009; 50(Suppl): S287–S292

Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1991;266(31):21232-8.

Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001;108(6):779-84.

Herz J. The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron* 2001;29(3):571-81.

Herzig MC, Van Nostrand WE, Jucker M. Mechanism of cerebral beta-amyloid angiopathy: murine and cellular models. *Brain Pathol* 2006;16(1):40-54.

Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, Hyman BT. Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol* 2000;47(6):739-47.

Honkaniemi J, Sharp FR. Global ischemia induces immediate-early genes encoding zinc finger transcription factors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(4):557-65.

Honkaniemi J, States BA, Weinstein PR, Espinoza J, Sharp FR. Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17(6):636-46.

Horstmann S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke* 2003;34(9):2165-70.

Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2001 Dec;24(12):719-25.

Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(3):H1241-8.

I

Ishrat T, Soliman S, Guan W, Saler M, Fagan SC. Vascular protection to increase the safety of tissue plasminogen activator for stroke. *Curr Pharm Des* 2012;18(25):3677-84.

Ito S, Ohtsuki S, Terasaki T. Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci Res* 2006;56(3):246-52.

J

Jensen LJ, Flyvbjerg A, Bjerre M. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Product: A Biomarker for Acute Coronary Syndrome. *Biomed Res Int.* 2015;2015:815942.

Jeynes B, Provias J. Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis *Curr Alzheimer Res* 2008;5:432-7.

Jickling GC, Liu D, Ander BP, Stamova B, Zhan X, Sharp FR. Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015;35(6):888-901.

Jickling GC, Liu D, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Lu A, Sharp FR. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(2):185-99.

Jickling GC, Zhan X, Ander BP, Turner RJ, Stamova B, Xu H, Tian Y, Liu D, Davis RR, Lapchak PA, Sharp FR. Genome response to tissue plasminogen activator in experimental ischemic stroke. *BMC Genomics* 2010;11:254.

Jin AY, Tuor UI, Rushforth D, Kaur J, Muller RN, Petterson JL, Boutry S, Barber PA. Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke. *BMC Neurosci* 2010;11: 12.

Johnson MM, Michelhaugh SK, Bouhamdan M, Schmidt CJ, Bannon MJ. The Transcription Factor NURR1 Exerts Concentration-Dependent Effects on Target Genes Mediating Distinct Biological Processes. *Front Neurosci* 2011;5:135.

Joice SL, Mydeen F, Couraud PO, Weksler BB, Romero IA, Fraser PA, Easton AS. Modulation of blood-brain barrier permeability by neutrophils: in vitro and in vivo studies. *Brain Res* 2009 Nov 17;1298:13-23.

Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, San Román L, Serena J, Abilleira S, Ribó M, Millán M, Urra X, Cardona P, López-Cancio E, Tomasello A, Castaño C, Blasco J, Aja L, Dorado L, Quesada H, Rubiera M, Hernandez-Pérez M, Goyal M, Demchuk AM, von Kummer R, Gallofré M, Dávalos A; REVASCAT Trial Investigators. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(24):2296-306

Justicia C, Panés J, Solé S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(12):1430-40.

K

Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett* 2003;350(2):113-6.

Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, Koo EH. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* 2000;106(9):1159-66.

Kawano M, Kawakami M, Otsuka M, Yashima H, Yaginuma T, Ueki A. Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 1995;239(2):209-211.

Keep RF, Zhou N, Xiang J, Andjelkovic AV, Hua Y, Xi G. Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage. *Fluids Barriers CNS* 2014;11:18.

Khan AS, Qureshi AI. The Trevo Retriever thrombectomy device for acute ischemic stroke: is there room for another tool in the toolbox? *J Neuroimaging* 2013;23(1):5-6.

Kharitonova T, Thorén M, Ahmed N, Wardlaw JM, von Kummer R, Thomassen L, et al; SITS investigators. Disappearing hyperdense middle cerebral artery sign in ischaemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis: clinical course and prognostic significance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:273–278.

Kim MH, Kang SY, Kim MC, Lee WI. Plasma biomarkers in the diagnosis of acute ischemic stroke. *Ann Clin Lab Sci* 2010;40(4):336-41.

Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston criteria. *Neurology* 2001;56(4):537-9.

Koenig MA, Puttgen HA, Prabhakaran V, Reich D, Stevens RD. B-type natriuretic peptide as a marker for heart failure in patients with acute stroke. *Intensive Care Med* 2007;33(9):1587-93.

Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterov MI, Lazo JS. Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry* 2001;40(12):3553-3560.

Koudinov AR, Berezov TT, Kumar A, Koudinova NV. Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin Chim Acta* 1998;270(2):75-84.

Kumar-Singh S. Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. *Genes Brain Behav* 2008;7 Suppl 1:67-82.

Kumar-Singh S. Hereditary and sporadic forms of abeta-cerebrovascular amyloidosis and relevant transgenic mouse models. *Int J Mol Sci* 2009;10(4):1872-95.

L

Ladu MJ, Reardon C, Van Eldik L, Fagan AM, Bu G, Holtzman D, Getz GS. Lipoproteins in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2000;903:167-75.

LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 2005;11(4):170-6.

Lai CH, Kuo KH. The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Rev* 2005;50: 258 – 265.

Lambert, J C, Heath, S, Even, G, Campion, D, Sleegers, K, Hiltunen, M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O; European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease *Nature Genetics* 2009;41(10):1094-1099

Lansberg MG, Albers GW, Wijman CA. Symptomatic intracerebral hemorrhage following thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: a review of the risk factors. *Cerebrovasc Dis* 2007;24(1):1-10.

Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 1992;6(12):2129-35.

Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 2003;33(1):85-9.

Lefterov I, Fitz NF, Cronican AA, Fogg A, Lefterov P, Kodali R, Wetzel R, Koldamova R. Apolipoprotein A-I deficiency increases cerebral amyloid angiopathy and cognitive deficits in APP/PS1DeltaE9 mice. *J Biol Chem* 2010;285(47):36945-57.

Levin EG, del Zoppo GJ. Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *Am J Pathol* 1994;144(5):855-61.

Lewis TL, Cao D, Lu H, Mans RA, Su YR, Jungbauer L, Linton MF, Fazio S, LaDu MJ, Li L. Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2010;285(47):36958-68.

Li Y, Lu W, Marzolo MP, Bu G. Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem* 2001;276(21):18000-6.

Lie PP, Cheng CY, Mruk DD. The biology of interleukin-1: emerging concepts in the regulation of the actin cytoskeleton and cell junction dynamics. *Cell Mol Life Sci* 2012;69: 487-500.

Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M, van Buchem MA, Bruckmann H, Greenberg SM. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2010;74(17):1346-50.

Lippmann, E. S.; Weidenfeller, C.; Svendsen, C. N.; Shusta, E. V. Blood-brain barrier modeling with co-cultured neural progenitor cell-derived astrocytes and neurons. *J. Neurochem* 2011; 119:507–520.

Liu D, Jia H, Holmes DJ, Stannard A, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(11):2002-7.

Llombart V, García-Berrocó T, Bustamante A, Giralt D, Rodríguez-Luna D, Muchada M, Penalba A, Boada C, Hernández-Guillamon M1, Montaner J. Plasmatic RBP4 and GFAP as biomarkers to differentiate ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *J Neurochem*. 2015 Nov 3. doi: 10.1111/jnc.13419.

Lu A, Tang Y, Ran R, Ardizzone TL, Wagner KR, Sharp FR. Brain genomics of intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(2):230-52.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1999;155(3):853-62.

Ly JV, Donnan GA, Villemagne VL, Zavala JA, Ma H, O'Keefe G, Gong SJ, Gunawan RM, Saunderson T, Ackerman U, Tochon-Danguy H, Churilov L, Phan TG, Rowe CC. 11C-PIB binding is increased in patients with cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *Neurology* 2010;74(6):487-93.

M

Mackenzie JM, Clayton JA. Early cellular events in the penumbra of human spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 1999;8(1):1-8.

Mages HW¹, Rilke O, Bravo R, Senger G, Kroczeck RA. NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol Endocrinol*. 1994;8(11):1583-91.

Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-37. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;903:167-75.

Man S, Ubogu EE, Williams KA, Tucky B, Callahan MK, Ransohoff RM. Human brain microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells differentially facilitate leukocyte recruitment and utilize chemokines for T cell migration. *Clin Dev Immunol*. 2008;2008:384982.

Mandybur TI. Cerebral amyloid angiopathy: the vascular pathology and complications. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986;45(1):79-90.

Marti-Fábregas J, Bravo Y, Cocho D, Martí-Vilalta JL, Díaz-Manera J, San Román L, Puig M, Blanco M, Castellanos M, Millán M, Roquer J, Obach V, Maestre J. Frequency and predictors of symptomatic intracerebral hemorrhage in patients with ischemic stroke treated with recombinant tissue plasminogen activator outside clinical trials. *Cerebrovasc Dis* 2007;23:85-90.

Marzolo MP, Farfán P. *Biol Res* 2011;44(1):89-105. New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression.

Marzolo MP, Yuseff MI, Retamal C, Donoso M, Ezquer F, Farfan P, Li Y, Bu G. Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic* 2003;4(4):273-288.

Matsubara E, Frangione B, Ghiso J. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction *J Biol Chem* 1995;270:7563-7

Matsubara E, Soto C, Governale S, Frangione B, Chiso J. Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility *Biochemical Journal* 1996;316(Pt 2):671-679

Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997;77(4):1081-132.

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 2010;330(6012):1774.

Mayer SA, Rincon F. Treatment of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol* 2005;4(10):662-72.

McEvoy AN, Murphy EA, Ponnio T, Conneely OM, Bresnihan B, FitzGerald O, Murphy EP. Activation of nuclear orphan receptor NURR1 transcription by NF-kappa B and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Immunol* 2002;168(6):2979-87.

Mendioroz M, Fernández-Cadenas I, Alvarez-Sabín J, Rosell A, Quiroga D, Cuadrado E, Delgado P, Rubiera M, Ribó M, Molina C, Montaner J. Endogenous activated protein C predicts hemorrhagic transformation and mortality after tissue plasminogen activator treatment in stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2009;28(2):143-50.

Merched A, Xia Y, Visvikis S, Serot JM, Siest G. Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000;21(1):27-30.

Merino-Zamorano C, Delgado P, Fernández de Retana S, Fernández-Cadenas I, Rodríguez-Luna D, Montaner J, Hernández-Guillamon M. Identification of Plasma Biomarkers of Human Intracerebral Hemorrhage Subtypes through Microarray Technology. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015a Dec 29.

Merino-Zamorano C, Hernández-Guillamon M, Jullienne A, Le Béhot A, Bardou I, Parés M, Fernández-Cadenas I, Giralto D, Carrera C, Ribó M, Vivien D, Ali C, Rosell A, Montaner J. NURR1 involvement in recombinant tissue-type plasminogen activator treatment complications after ischemic stroke. *Stroke*. 2015b;46(2):477-84.

Michael BD, Griffiths MJ, Granerod J, Brown D, Keir G, Wnęk M, Cox DJ, Vidyasagar R, Borrow R, Parkes LM, Solomon T. The interleukin-1 balance is associated with clinical severity, blood-brain barrier permeability, neuroimaging changes and outcome in encephalitis. *J Infect Dis.* 2015 Dec 27.

Michaelson DM. APOE ϵ 4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014;10(6):861-8.

Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2008;18(2):240-52.

Miranda E, Lomas DA. Neuroserpin: a serpin to think about. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(6):709-22.

Mockel B, Zinke H, Flach R, Weiss B, Weiler-Guttler H, Gassen HG. Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium in vitro. *J. Neurochem* 1994;62(2):788-798.

Modrego PJ, Boned B, Berlanga JJ, Serrano M. Plasmatic B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in hyperacute stroke as markers of CT-evidence of brain edema. *Int J Med Sci* 2008;5(1):18-23.

Mohr JP, Caplan LR, Melski JW, Goldstein RJ, Duncan GW, Kistler JP. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology* 1978; 28:754-762.

Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke.* 2001 Dec 1;32(12):2762-7.

Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, García-Berrocoso T, Giralt D, Merino C, Ribó M, Rosell A, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Romero F, Molina C, Alvarez-Sabín J, Hernández-Guillamon M. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics* 2012;75(15):4758-65.

Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, García-Berrocoso T, Giralt D, Merino C, Ribó M, Rosell A, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Romero F, Molina C, Alvarez-Sabín J, Hernández-Guillamon M. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics* 2012;75:4758-4765.

Montaner J. Latest advances and research in stroke: highlights from the 31st International Stroke Conference. *Drug News Perspect* 2006;19(3):173-83.

Montaner J. Molecular signatures of course and prognosis of intracerebral hemorrhage. *Seminars in cerebrovascular diseases and stroke* 2005;5:178-188.

Montaner, J, Molina, CA, Monasterio, J, Abilleira, S, Arenillas, JF, Ribo, M, Quintana, M, Alvarez-Sabin, J. Matrix metalloproteinase- 9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003;107, 598–603.

Montañola A, de Retana SF, López-Rueda A, Merino-Zamorano C, Penalba A, Fernández-Álvarez P, Rodríguez-Luna D, Malagelada A, Pujadas F, Montaner J, Hernández-Guillamon M. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med* 2015 Dec 14

Morgenstern LB, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, Bendok BR, Cushman M, Fung GL, Goldstein JN, Macdonald RL, Mitchell PH, Scott PA, Selim MH, Woo D. American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2010; 41:2108-29.

Mysiorek C, Culot M, Dehouck L, Derudas B, Staels B, Bordet R, Cecchelli R, Fenart L, Berezowski V. Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha activation protects brain capillary endothelial cells from oxygen-glucose deprivation-induced hyperpermeability in the blood-brain barrier. *Curr Neurovasc Res* 2009;6(3):181-93.

N

Nagababu E, Usatyuk PV, Enika D, Natarajan V, Rifkind JM. Vascular endothelial barrier dysfunction mediated by amyloid-beta proteins. *J Alzheimers Dis* 2009;17(4):845-54.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 1991;541(1):163-6.

Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 2000;283(12):1571-7.

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992;267(21):14998-5004.

Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001;7(1):59-64.

Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Ironside JW, Vinters HV. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 in patients with cerebral hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1996;39(5):682-3.

Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Barron M, Lederer M, Wang X, Zhu M, Sorensen AG, Lo EH, Kelly PJ. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* 2006 May 23;66(10):1550-5.

Niwa K, Carlson GA, Iadecola C. Exogenous A beta1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000 Dec;20(12):1659-68.

Niwa K, Kazama K, Younkin L, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C. Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002b;283(1):H315-23.

Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis*. 2002a;9(1):61-8.

Nozawa K, Casiano CA, Hamel JC, Molinaro C, Fritzler MJ, Chan EK. Fragmentation of Golgi complex and Golgi autoantigens during apoptosis and necrosis. *Arthritis Res* 2002;4(4):R3.

Nsegbe E, Wallén-Mackenzie A, Dager S, Roux JC, Shvarev Y, Lagercrantz H, Perlmann T, Herlenius E. Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in Nurr1 mutant mice. *J Physiol* 2004;556(Pt 1):43-59.

O

O'Kane M, Markham T, McEvoy AN, Fearon U, Veale DJ, FitzGerald O, Kirby B, Murphy EP. Increased expression of the orphan nuclear receptor NURR1 in psoriasis and modulation following TNF-alpha inhibition. *J Invest Dermatol* 2008;128(2):300-10.

O'Kane M, Markham T, McEvoy AN, Fearon U, Veale DJ, FitzGerald O, Kirby B, Murphy EP. Increased expression of the orphan nuclear receptor NURR1 in psoriasis and modulation following TNF-alpha inhibition. *J Invest Dermatol* 2008;128(2):300-10.

Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1977;1(5):409-17.

P

Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM, Briens A, Hommet Y, Wu J, Yepes M, Lijnen HR, Dutar P, Anglés-Cano E, Vivien D. Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 2012;19(12):1983-91.

Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Molec Biotech* 2005;30:57-68.

Paré G, Ridker PM, Rose L, Barbalic M, Dupuis J, Dehghan A, Bis JC, Benjamin EJ, Shiffman D, Parker AN, Chasman DI. Genome-wide association analysis of soluble ICAM-1 concentration reveals novel associations at the NFKB1K, PNPLA3, RELA, and SH2B3 loci. *PLoS Genet*. 2011 Apr;7(4):e1001374.

Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Pitstick R, Younkin S, Carlson GA, Iadecola C. NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide. *J Neurosci*. 2005;25(7):1769-77.

Paula-Lima, AC, Tricerri, M A, Brito-Moreira, J, Bomfim, T R, Oliveira, F F, Magdesian, M H, Grinberg LT, Panizzutti R, Ferreira ST Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Abeta-induced neurotoxicity *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(6):1361-1370

Pereira VM, Narata AP, Gonzalez AM, Sztajzel R, Lovblad KO. Use of stentrievors in acute stroke: tips, tricks, and current results. *Tech Vasc Interv Radiol* 2012;15(1):68-77.

Pessin MS, Del Zoppo GJ, Estol CJ. Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol* 1990;13(4):271-89.

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1987;917(1):148-61.

Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganthan S, Lawrence DA, Strickland D, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 2007;109(8):3270-8.

Q

Quinn KA, Grimsley PG, Dai YP, Tapner M, Chesterman CN, Owensby DA. Soluble low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) circulates in human plasma. *J Biol Chem* 1997;272(38):23946-51.

Qureshi A, Palesch Y. Expansion of recruitment time window in antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage (ATACH) II trial. *J Vasc Interv Neurol* 2012;5:6-9.

Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, Kim SH, Ali Z, Shatla AA, Guterman LR, Hopkins LN. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* 2003;52(5):1041-7.

Qureshi AI. Antihypertensive Treatment of Acute Cerebral Hemorrhage (ATACH): rationale and design. *Neurocrit Care* 2007;6: 56-66.

Qureshi, AI; Mendelow, AD; Hanley, DF.. Intracerebral hemorrhage. *Lancet* 2009;373:1632-1644.

R

Rannikmäe K, Kalaria RN, Greenberg SM, Chui HC, Schmitt FA, Samarasekera N, Al-Shahi Salman R, Sudlow CL. APOE associations with severe CAA-associated vasculopathic changes: collaborative meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85(3):300-5

Renard D, Castelnovo G, Wacogne A, Le Floch A, Le Floch A, Thouvenot E, Mas J, Gabelle A, Labauge P, Lehmann S. Interest of CSF biomarker analysis in possible CAA cases defined by the modified Boston criteria. *J Neurol* 2012;259(11):2429-33.

Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Quintana M, Alvarez-Sabín J. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke* 2004;35(9):2123-7.

Ribo M, y Grotta, J. Latest advances in intracerebral hemorrhage. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006;6:17-22.

Rincon F, Mayer SA. Clinical review: Critical care management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *Crit Care* 2008;12: 237.

Robert J, Stukas S, Button E, Cheng WH, Lee M, Fan J, Wilkinson A, Kubic I, Wright SD, Wellington CL. Reconstituted high-density lipoproteins acutely reduce soluble brain A β levels in symptomatic APP/PS1 mice. *Biochim Biophys Acta* 2015 Oct 9.

Rodríguez-González R, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Moldes O, Castillo J, Sobrino T. Platelet derived growth factor-CC isoform is associated with hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Atherosclerosis* 2013;226(1):165-71.

Rodriguez-Luna D, Piñeiro S, Rubiera M, Ribo M, Coscojuela P, Pagola J, Flores A, Muchada M, Ibarra B, Meler P, Sanjuan E, Hernandez-Guillamon M, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Molina CA. Impact of blood pressure changes and course on hematoma growth in acute intracerebral hemorrhage. *Eur J Neurol* 2013;20(9):1277-83.

Roher AE, Kasunic TC, Woods AS, Cotter RJ, Ball MJ, Fridman R. Proteolysis of A beta peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205(3):1755-61.

Romanic AM, Graesser D, Baron JL, Visintin I, Janeway CA Jr, Madri JA. T cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix is modulated upon transendothelial cell migration. *Lab Invest*. 1997 Jan;76(1):11-23.

Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008;39(4):1121-6.

Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Lo EH, Montaner J. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006;37(6):1399-406.

Rosell A, Vilalta A, García-Berrocoso T, Fernández-Cadenas I, Domingues-Montanari S, Cuadrado E, Delgado P, Ribó M, Martínez-Sáez E, Ortega-Aznar A, Montaner J. Brain perihematoma genomic profile following spontaneous human intracerebral hemorrhage. *PLoS One* 2011 Feb 2;6(2):e16750.

Roudbary SA, Saadat F, Forghanparast K, Sohrabnejad R. Serum C-reactive protein level as a biomarker for differentiation of ischemic from hemorrhagic stroke. *Acta Med Iran* 2011;49(3):149-52.

Roudbary SA, Saadat F, Forghanparast K, Sohrabnejad R. Serum C-reactive protein level as a biomarker for differentiation of ischemic from hemorrhagic stroke. *Acta Med Iran* 2011;49:149-152.

S

Saczynski JS, White L, Peila RL, Rodriguez BL, Launer LJ. The relation between apolipoprotein A-I and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Am J Epidemiol* 2007;165(9):985-92.

Saczynski JS¹, White L, Peila RL, Rodriguez BL, Launer LJ. The relation between apolipoprotein A-I and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *American Journal of Epidemiology* 2007;165(9):985-992.

Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 2009;137(1):47-59.

Saint-Pol J, Candela P, Boucau MC, Fenart L, Gosselet F. Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of A β peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain

barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 2013;1517:1-15.

Saint-Pol J, Vandehaute E, Boucau MC, Candela P, Dehouck L, Cecchelli R, Dehouck MP, Fenart L, Gosselet F. Brain pericytes ABCA1 expression mediates cholesterol efflux but not cellular amyloid- β peptide accumulation. *J Alzheimers Dis* 2012;30:489-503.

Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 1999;126(18):4017-26.

Sarada S, Himadri P, Mishra C, Geetali P, Ram MS, Ilavazhagan G. Role of oxidative stress and NF κ B in hypoxia-induced pulmonary edema. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233(9):1088-98.

Sarkar O, Mathur PP, Cheng CY, Mruk DD. Interleukin 1 alpha (IL1A) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat. *Biol Reprod* 2008;78(3):445-54.

Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, Albers GW, Cognard C, Cohen DJ, Hacke W, Jansen O, Jovin TG, Mattle HP, Nogueira RG, Siddiqui AH, Yavagal DR, Baxter BW, Devlin TG, Lopes DK, Reddy VK, du Mesnil de Rochemont R, Singer OC, Jahan R; SWIFT PRIME Investigators. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(24):2285-95.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400(6740):173-7.

Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(20):9649-53.

Schmidt AM, Sahagan B, Nelson RB, Selmer J, Rothlein R, Bell JM. The role of RAGE in amyloid-beta peptide-mediated pathology in Alzheimer's disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10(7):672-80.

Schrijvers, E M, Koudstaal, P J, Hofman, A, Breteler, MM Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease JAMA Network 2011;305(13):1322-1326

Schürmann B, Wiese B, Bickel H, Weyerer S, Riedel-Heller SG, Pentzek M, Bachmann C, Williams J, van den Bussche H, Maier W, Jessen F Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration J Alzheimers Dis 2011;25(3):421-4

Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol 1998;8,447-453.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. J Alzheimers Dis 2001;3(1):75-80.

Selvais C, D'Auria L, Tyteca D, Perrot G, Lemoine P, Troeberg L, Dedieu S, Noël A, Nagase H, Henriët P, Courtoy PJ, Marbaix E, Emonard H. Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. FASEB J. 2011;25(8):2770-81.

Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. FASEB J 1993;7(11):1031-1038.

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. J Clin Invest 2000;106(12):1489-99.

Siao CJ, Fernandez SR, Tsirka SE. Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. J Neurosci 2003;23(8):3234-42.

Silva Y, Leira R, Tejada J, Lainez JM, Castillo J, Dávalos A; Stroke Project, Cerebrovascular Diseases Group of the Spanish Neurological Society. Molecular signatures of vascular injury are associated with early growth of intracerebral hemorrhage. Stroke 2005;36(1):86-91.

Silverberg GD, Messier AA, Miller MC, Machan JT, Majmudar SS, Stopa EG, Donahue JE, Johanson CE. Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging. J Neuropathol Exp Neurol 2010;69(10):1034-43.

Smith EE, Gurol ME, Eng JA, Engel CR, Nguyen TN, Rosand J, Greenberg SM. White matter lesions, cognition, and recurrent hemorrhage in lobar intracerebral hemorrhage. Neurology 2004;63(9):1606-12.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010;119(1):7-35.

Spuch C, Ortolano S, Navarro C. LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease. *Front Physiol* 2012;3:269.

Spuch C., Navarro C. Transport Mechanisms at the Blood-Cerebrospinal-Fluid Barrier: role of Megalin (LRP2). *Recent Patents Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 2010a;4, 190–205.

Spuch C., Navarro C. Expression and functions of LRP-2 in central nervous system: progress in understanding its regulation and the potential use for treatment of neurodegenerative diseases. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem* 2010b;10, 249–254.

Stamova B, Xu H, Jickling G, Bushnell C, Tian Y, Ander BP, Zhan X, Liu D, Turner R, Adamczyk P, Khoury JC, Pancioli A, Jauch E, Broderick JP, Sharp FR. Gene expression profiling of blood for the prediction of ischemic stroke. *Stroke.* 2010;41(10):2171-7.

Stanimirovic DB, Friedman A. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32(7):1207-21

Stinton LM, Eystathioy T, Selak S, Chan EK, Fritzler MJ. Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. *Clin Immunol* 2004;110(1):30-44.

Stukas S, Robert J, Lee M, Kulic I, Carr M, Tourigny K, Fan J, Namjoshi D, Lemke K, DeValle N, Chan J, Wilson T, Wilkinson A, Chapanian R, Kizhakkedathu JN, Cirrito JR, Oda MN, Wellington CL. Intravenously injected human apolipoprotein A-I rapidly enters the central nervous system via the choroid plexus. *J Am Heart Assoc* 2014;3(6):e001156.

Sturchler E, Galichet A, Weibel M, Leclerc E, Heizmann CW. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *J Neurosci* 2008;28(20):5149-58.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Nov 25;94(24):13287-92.

Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, Gao Y, Pietras K, Mann K, Yepes M, Strickland DK, Betsholtz C, Eriksson U, Lawrence DA. Activation of PDGF-CC by tissue

plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* 2008;14(7):731-7.

Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 2009;114(15):3352-8.

Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, Van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 1988;19(5):604-7.

T

Tang Y, Lu A, Aronow BJ, Sharp FR. Blood genomic responses differ after stroke, seizures, hypoglycemia, and hypoxia: blood genomic fingerprints of disease. *Ann Neurol* 2001;50(6):699-707.

Tang Y, Xu H, Du X, Lit L, Walker W, Lu A, Ran R, Gregg JP, Reilly M, Pancioli A, Khoury JC, Sauerbeck LR, Carrozzella JA, Spilker J, Clark J, Wagner KR, Jauch EC, Chang DJ, Verro P, Broderick JP, Sharp FR. Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(8):1089-102.

Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic BV, Frangione B, Blennow K, Ménard J, Zetterberg H, Wisniewski T, de Leon MJ. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2015;11(8):457-70.

Terruso V, D'Amelio M, Di Benedetto N, Lupo I, Saia V, Famoso G, Mazzola MA, Aridon P, Sarno C, Ragonese P, Savettieri G. Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction. *Neuroepidemiology* 2009;33(3):261-5.

Thal DR, Griffin WS, Braak H. Parenchymal and vascular A β -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2008;12:1848-1862.

Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature*. 1996;380(6570):168-71.

Tilling T, Korte D, Hoheisel D, Galla HJ. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem* 1998;71(3):1151-7.

Townsend KP1, Obregon D, Quadros A, Patel N, Volmar Ch, Paris D, Mullan M. Proinflammatory and vasoactive effects of Abeta in the cerebrovasculature. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;977:65-76.

Trouillas P, Derex L, Philippeau F, Nighoghossian N, Honnorat J, Hanss M, Ffrench P, Adeleine P, Dechavanne M. Early fibrinogen degradation coagulopathy is predictive of parenchymal hematomas in cerebral rt-PA thrombolysis: a study of 157 cases. *Stroke* 2004;35(6):1323-8.

Tsivgoulis G, Eggers J, Ribo M, Perren F, Saqqur M, Rubiera M, Sergentanis TN, Vadikolias K, Larrue V, Molina CA, Alexandrov AV. Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis: a comprehensive review and meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Stroke* 2010;41(2):280-7.

Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo EH. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2005 Sep;36(9):1954-9.

Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, Walker D, Scheff S, McGillis JP, Rydel RE, Estus S. The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci*. 2000;20(11):3937-46.

U

Undén J, Strandberg K, Malm J, Campbell E, Rosengren L, Stenflo J, Norrving B, Romner B, Lindgren A, Andsberg G. Explorative investigation of biomarkers of brain damage and coagulation system activation in clinical stroke differentiation. *J Neurol* 2009;256(1):72-7.

V

Vargas T., Bullido M. J., Martinez-Garcia A., Antequera D., Clarimon J., Rosich-Estrago M., Martin-Requero A., Mateo I., Rodriguez-Rodriguez E., Vilella-Cuadrada E., Frank A., Lleo A., Molina-Porcel L., Blesa R., Combarros O., Gomez-Isla T., Bermejo-Pareja F., Valdivieso F., Carro

E. A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer's disease risk. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet* 2010;153B:895–902.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999;286(5440):735-41.

Verbeek MM, Kremer BP, Rikkert MO, Van Domburg PH, Skehan ME, Greenberg SM. Cerebrospinal fluid amyloid beta(40) is decreased in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 2009;66(2):245-9.

Vergheze PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, Bu G, Frieden C, Holtzman DM. ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(19):E1807-16.

Vinters HV. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke* 1987;18(2):311-24.

Vollbach H, Heun R, Morris CM, Edwardson JA, McKeith IG, Jessen F, Schulz A, Maier W, Kölsch H. APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann Neurol* 2005;58(3):436-41.

W

Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 2007;101(5):1172-84.

Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 1999;158(2):328-37.

Wang J, Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 894-908.

Wang J, Tsirka SE. Contribution of extracellular proteolysis and microglia to intracerebral hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2005;3(1):77-85.

Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. *Prog Neurobiol* 2010;92(4):463-77.

Webster SJ, Mruthinti S, Hill WD, Buccafusco JJ, Terry AV Jr. An aqueous orally active vaccine targeted against a RAGE/AB complex as a novel therapeutic for Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2012;14(2):119-30.

Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 2013;10(1):16.

Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005;19:1872–1874.

Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998;153(3):725-33.

Willnow TE, Goldstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem* 1992;267(36):26172-80.

Wisniewski HM, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B. In vitro production of beta-amyloid in smooth muscle cells isolated from amyloid angiopathy-affected vessels. *Neurosci Lett* 1995;183(1-2):120-3.

Wisniewski T, Castañó EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 1994;145(5):1030-5.

Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(2):138-52.

Woo D, Sekar P, Chakraborty R, Haverbusch MA, Flaherty ML, Kissela BM, Kleindorfer D, Schneider A, Khoury J, Sauerbeck LR, Deka R, Broderick JP. Genetic epidemiology of intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2005;14: 239–243.

Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 2003;9(4):453-7.

X

Xu PY, Liang R, Jankovic J, Hunter C, Zeng YX, Ashizawa T, Lai D, Le WD. Association of homozygous 7048G7049 variant in the intron six of *Nurr1* gene with Parkinson's disease. *Neurology* 2002;58(6):881-4.

Xue M, Fan Y, Liu S, Zygun DA, Demchuk A, Yong VW. Contributions of multiple proteases to neurotoxicity in a mouse model of intracerebral haemorrhage. *Brain* 2009 Jan;132(Pt 1):26-36.

Y

Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T. Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta. *J Neurosci* 2009;29(36):11393-8.

Yamada M, Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* 2000;20:8-22.

Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke* 2015;17(1):17-30.

Yamada, M. Cerebral amyloid angiopathy and gene polymorphisms. *J Neurol Sci* 2004;226: 41–44.

Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J, Hsu CY, Holtzman DM, Lee JM. Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24566-74.

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996;382(6593):685-91.

Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res* 2010;106(5):842-53.

Yang Y, Keene CD, Peskind ER, Galasko DR, Hu SC, Cudaback E, Wilson AM, Li G, Yu CE, Montine KS, Zhang J, Baird GS, Hyman BT, Montine TJ. Cerebrospinal Fluid Particles in Alzheimer Disease and Parkinson Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(7):672-87.

Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* 2009;32(1):48-55.

Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 2003;112(10):1533-40.

Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, Wilson MR. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J* 2007;21:2312-22.

Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ. A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* 2007;27(52):14459-69.

Z

Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* 1997;276(5310):248-50.

Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M, Zivin JA. Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke* 1999;30(3):624-9.

Zhang X, Lu XM, Huang LF, Ye H. Copeptin is associated with one-year mortality and functional outcome in patients with acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Peptides* 2012;33:336-341.

Zhang X, Polavarapu R, She H, Mao Z, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am J Pathol* 2007a;171(4):1281-90.

Zhang Y, Reilly KH, Tong W, Xu T, Chen J, Bazzano LA, Qiao D, Ju Z, Chen CS, He J. Blood pressure and clinical outcome among patients with acute stroke in Inner Mongolia, China. *J Hypertens* 2008;26:1446-1452.

Zhao X, Zhang Y, Strong R, Grotta JC, Aronowski J. 15d-Prostaglandin J2 activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, promotes expression of catalase, and reduces inflammation, behavioral dysfunction, and neuronal loss after intracerebral hemorrhage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(6):811-20.

Zheng K, Heydari B, Simon DK. A common NURR1 polymorphism associated with Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Arch Neurol* 2003;60(5):722-5.

Zhou Y, Wang Y, Wang J, Anne Stetler R, Yang QW. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation. *Prog Neurobiol* 2014;115:25-44.

Zlokovic BV, Deane R, Sagare AP, Bell RD, Winkler EA. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 2010;115(5):1077-89.

Zlokovic BV, Frangione B. Transport-clearance hypothesis for Alzheimer's disease and potential therapeutic implications. *Madame Curie Bioscience Database*. 2003 [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5975/>

Zlokovic BV. Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci* 1996;59(18):1483-97.

Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2004;89:807-11.

Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005;28(4):202-8.

