



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>

Programa de Doctorado de Cirugía y Ciencias morfológicas

Departamento de Ciencias morfológicas

**Estudio patológico de biomarcadores
en la Angiopatía Amiloide Cerebral y la
Enfermedad de Alzheimer**

Jessica Camacho Soriano

Tesis doctoral UAB/2021



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Ciencias morfológicas

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias morfológicas

Facultad de Medicina

Barcelona, 2021

Estudio patológico de biomarcadores en la Angiopatía Amiloide Cerebral y la Enfermedad de Alzheimer

Jessica Camacho Soriano

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Anatomía Patológica del H.U.Vall d'Hebron bajo la supervisión de los directores doctores:

Elena Antima Martínez Sáez

Mar Hernández Guillamon

Tutor: Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Barcelona, 2021

El Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras, catedrático del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron,

CERTIFICA:

Que Doña Jessica Camacho Soriano ha realizado bajo la dirección de los abajo firmantes el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral:

**ESTUDIO PATOLÓGICO DE BIOMARCADORES EN LA ANGIOPATÍA AMILOIDE
CEREBRAL Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Revisado el presente trabajo, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Dr. Santiago Ramón y Cajal

Barcelona, 2021

Directores de la tesis:

Dra. Elena Antima Martínez Sáez

Departamento de Anatomía Patológica

H. U. Vall d'Hebron, Barcelona

Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Departamento de Anatomía Patológica

H. U. Vall d'Hebron, Barcelona

Dra. Mar Hernández Guillamon

Laboratorio de investigación

neurovascular. Institut de Recerca Vall

d'Hebron, Barcelona

A Fran, Biel y Kai.
A mis padres y hermana.

“Do, or do not. There is no try”

Yoda, Star wars

ÍNDICE

Abreviaturas.....	17
Introducción.....	21
1. Angiopatía amiloide cerebral.....	23
1.1. Epidemiología y clínica.....	23
1.2. Hallazgos neuropatológicos.....	24
1.3. Diagnóstico y tratamiento de la AAC.....	28
2. Enfermedad de Alzheimer.....	29
2.1. Epidemiología y clínica.....	29
2.2. Hallazgos neuropatológicos.....	31
2.2.1 Hallazgos macroscópicos.....	31
2.2.2 Hallazgos microscópicos.....	32
2.3. Concepto de taupatía.....	34
2.4. Diagnóstico y tratamiento de la EA.....	35
3. Interacción entre AAC y EA.....	40
4. Apolipoproteínas y β -amiloidosis cerebral.....	43
4.1. ApoE.....	43
4.2. Otras apolipoproteínas.....	44
5. CD2AP y EA.....	46
Hipótesis.....	49
Objetivos.....	53
Métodos.....	57
A) Estudio inmunohistoquímico de ApoE, ApoJ y ApoA-I en la AAC.....	59
A.1. Selección de pacientes.....	59
A.2. Técnicas inmunohistoquímicas.....	61
A.3. Evaluación de ApoE, ApoJ y ApoA-I.....	62

A.4. Genotipo ApoE.....	64
A.5. Análisis estadístico.....	64
B) Estudio inmunohistoquímico de CD2AP en la EA.....	64
B.1. Selección de pacientes.....	64
B.2. Evaluación de pTau y β A en EA y casos contro.....	66
B. 3. Evaluación de pTau y Tau-3R en otras taupatías.....	66
B. 4. Inmunohistoquímica para CD2AP.....	67
B. 5. Inmunofluorescencia para CD2AP.....	69
B.6. Análisis estadístico.....	69
Resultados.....	71
A) Estudio inmunohistoquímico de ApoE, ApoJ y ApoA-I en la AAC.....	73
A.1. Presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en arterias cerebrales.....	74
A.2. Presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en capilares corticales.....	76
A.3. Depósitos intraparenquimatosos de ApoE, ApoJ y ApoA-I.....	77
A.4. Análisis de la asociación de la presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I vascular y la HIC.....	80
B) Estudio inmunohistoquímico de CD2AP en la EA.....	82
B.1. Inmunopositividad de CD2AP en EA.....	82
B.2. Inmunopositividad de CD2AP en otras taupatías.....	88
Discusión.....	91
A) Estudio inmunohistoquímico de ApoE, ApoJ y ApoA-I en la AAC.....	93
B) Estudio inmunohistoquímico de CD2AP en la EA.....	98
Conclusiones.....	105
Bibliografía.....	109
Anexo.....	141

1. Artículo 1.....	143
2. Artículo 2.....	159
Agradecimientos.....	193

ABREVIATURAS

AAC: Angiopatía amiloide cerebral

ApoE: Apolipoproteína E

ApoJ: Apolipoproteína J

ApoA-I: Apolipoproteína A-I

APP: Proteína precursora del amiloide

β A: Beta-amiloide

β AXX: Beta-amiloide terminación carboxi XX. Por ejemplo, β A40, β A42

BHE: Barrera hemato-encefálica

CATREG: Análisis de regresión categórica

CERAD: Consorcio para establecer un registro de la enfermedad de Alzheimer, *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease*

CGA: Campos de gran aumento

CLU: Clusterina

DCB: Degeneración corticobasal

DE: Desviación estándar

EA: Enfermedad de Alzheimer

EE: Error estándar

EPI: Enfermedad de Pick

GWAS: Estudios de asociación del genoma completo, *Genome wide association studies*

Fundación CIEN: Fundación Centro de investigación de enfermedades neurológicas

H-E: Hematoxilina-eosina

HIC: Hemorragia intracerebral

HUVH: Hospital Universitari Vall d'Hebron

IC: Intervalo de confianza

INR: Índice internacional normalizado, *International Normalized Ratio*

IPAD: drenaje peri-arterial intramural

LCR: Líquido céfalo-raquídeo

NIA-AA: Instituto Nacional del envejecimiento y Asociación del Alzheimer, *National Institute of Aging and Alzheimer's Association*

OR: *Odds ratio*

PET: Tomografía por emisión de positrones, *Positron Emission Tomography*

PICALM: Proteína de ensamblaje de clatrina que se une a fosfatidilinositol, *phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein*

PNF: Patología neurofibrilar

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

PSP: Parálisis supranuclear progresiva

pTau: Proteína tau fosforilada

RM: Resonancia magnética

SH3: Dominios de homología Src 3

SNP: Polimorfismo de nucleótido único, *Single Nucleotid Polymorphism*

Tau 3R: isoforma de la proteína tau con 3 repeticiones

Tau 4R: isoforma de la proteína tau con 4 repeticiones

X²: Chi cuadrado

INTRODUCCIÓN

1. ANGIOPATÍA AMILOIDE CEREBRAL

1. 1. Epidemiología y clínica

La angiopatía amiloide cerebral (AAC) es una enfermedad del sistema nervioso central que se caracteriza por el depósito anómalo de amiloide en la vasculatura cerebral y se clasifica en diferentes tipos dependiendo de la proteína amiloide que se deposite. Hasta la fecha se conocen 7 proteínas diferentes implicadas en la AAC entre las que se incluyen la proteína β -amiloide (β A), cistatina-C, proteína amiloide priónica, transtirretina, ABri/ADan, gelsolina y proteína amiloide que proviene de inmunoglobulinas de cadena ligera¹. La forma más común de AAC se debe al depósito de β A, que suele ser una enfermedad esporádica y afecta mayoritariamente a ancianos². El β A insoluble se acumula en la pared de los vasos corticales y meníngeos, reemplazando las células del músculo liso e induciendo la degeneración vascular. Sin embargo, el β A también puede acumularse en los capilares cerebrales. Esta proteína se origina por el procesamiento anómalo secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) por la β -secretasa y la γ -secretasa, generando principalmente péptidos de 40 y 42 aminoácidos. El plegamiento anormal del material amiloide produce una estructura secundaria de lámina plegada en β , que forma fibrillas amiloides altamente insolubles³.

La prevalencia de la AAC esporádica aumenta con la edad y está presente en el 50% de las personas con más de 70 años, llegando al 80-90% de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA)⁴. La consecuencia clínica más relevante es la hemorragia intracerebral (HIC) que suele ser lobar y sintomática⁵. Se estima que la proporción de hemorragias espontáneas en ancianos atribuibles a AAC es de alrededor del 10% al 20% en series de autopsias y del 34% en series clínicas^{6, 7}. Estudios de Resonancia magnética cerebral (RM) han permitido identificar marcadores radiológicos característicos de la AAC como la presencia de microhemorragias

corticales lobares, siderosis superficial cortical, hemorragias subaracnoideas, hiperintensidades de la sustancia blanca, espacios perivasculares dilatados en el centro semioval y microinfartos corticales⁸. Otras consecuencias clínicas descritas en pacientes con AAC incluyen episodios neurológicos focales transitorios y recurrentes⁹. Además, estos pacientes suelen presentar deterioro cognitivo, menor velocidad de percepción y deterioro de la memoria episódica, independientemente de si tienen EA asociada o no⁷. A pesar de que la AAC es muy frecuente en pacientes con EA, la mayoría de los casos de AAC que desarrollan una HIC no presentan signos de demencia propias de la EA¹¹ y sólo una minoría de los pacientes diagnosticados de EA desarrollan una HIC relacionada con la AAC¹². Cabe destacar que la AAC no se asocia con hipertensión arterial, arteriosclerosis ni con amiloidosis en otros órganos¹³.

Existen formas familiares o hereditarias de AAC que a menudo se presentan a una edad más temprana con un cuadro clínico más grave, siendo formas extremadamente raras y relacionadas con trastornos autosómicos dominantes. En estos casos, con frecuencia se observa un deterioro cognitivo mientras que la HIC no es una característica que se dé en todos los casos¹³.

1.2. Hallazgos neuropatológicos

El depósito vascular de β A es irregular y segmentario, y se encuentra en vasos corticales y leptomeníngeos del cerebro y cerebelo, principalmente en las arterias. Sigue un patrón de distribución que se inicia en regiones posteriores cerebrales y se extiende a los lóbulos parietales, frontales y temporales y, finalmente, al cerebelo, siendo muy escaso el depósito de β A en vasos de los ganglios basales, tálamo, tronco cerebral y sustancia blanca⁴.

El depósito vascular de amiloide afecta inicialmente a vasos leptomeníngeos y corticales superficiales, mientras que en los casos más avanzados de AAC la mayoría de las arterias y arteriolas muestran un depósito de amiloide prominente. Las arterias

leptomeningeas de tamaño medio presentan el depósito en las regiones más periféricas de la capa media y adventicia mientras que las paredes vasculares de pequeñas arterias y arteriolas a menudo se encuentran completamente reemplazadas por este depósito, a excepción de las células endoteliales¹⁴.

La AAC puede clasificarse neuropatológicamente³ en dos tipos en función del tipo de vaso al que afecta (Fig. 1):

- AAC tipo I: los depósitos vasculares de β A afectan a arterias meníngeas, corticales y capilares cerebrales.
- AAC tipo II: afecta a arterias meníngeas y corticales, sin afectación de capilares.

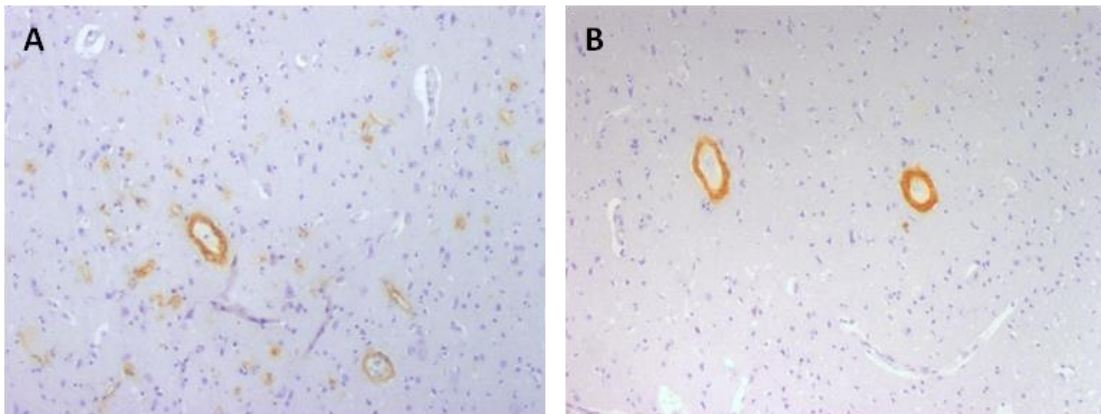


Fig.1. **A.** Ejemplo de AAC tipo I en la que se puede ver expresión inmunohistoquímica de β A en arterias corticales y capilares. **B.** Ejemplo de un caso de AAC tipo II en la que se observa depósito de β A únicamente en arterias corticales, sin depósito en paredes de capilares. 100x.

En 1991, Vonsattel et al. describieron una escala de afectación histológica de la AAC basada en las alteraciones morfológicas vasculares que identificó tras comparar casos de AAC sin y con HIC, que posteriormente en 1997 modificó junto a Greenberg et al.¹⁵,¹⁶ (Fig.2):

- Grado 0: ausencia de depósito vascular de amiloide.
- Grado 1: depósito vascular de amiloide en vasos sin alteraciones morfológicas destacables en la hematoxilina-eosina (H-E).

- Grado 2: vasos que muestran una sustitución de la capa media por depósito vascular de amiloide (vasos engrosados y de apariencia rígida).
- Grado 3: depósito vascular de amiloide en vasos con separación de las capas de la pared, dando lugar a imágenes en “doble carril”.
- Grado 4: depósito vascular de amiloide en vasos con necrosis fibrinoide de la pared, aterosclerosis y estructuras aneurismáticas.

Se han descrito otras escalas para gradar la severidad de la AAC definidas por ejemplo por la cantidad o forma del depósito de β A presente en los vasos, teniendo en cuenta el número de vasos afectados y si el depósito es parcheado o no^{17, 18}. El hecho de que no haya un consenso respecto a la gradación neuropatológica de la gravedad de la AAC impide un correcto análisis de los diferentes estudios patológicos entre diferentes centros.

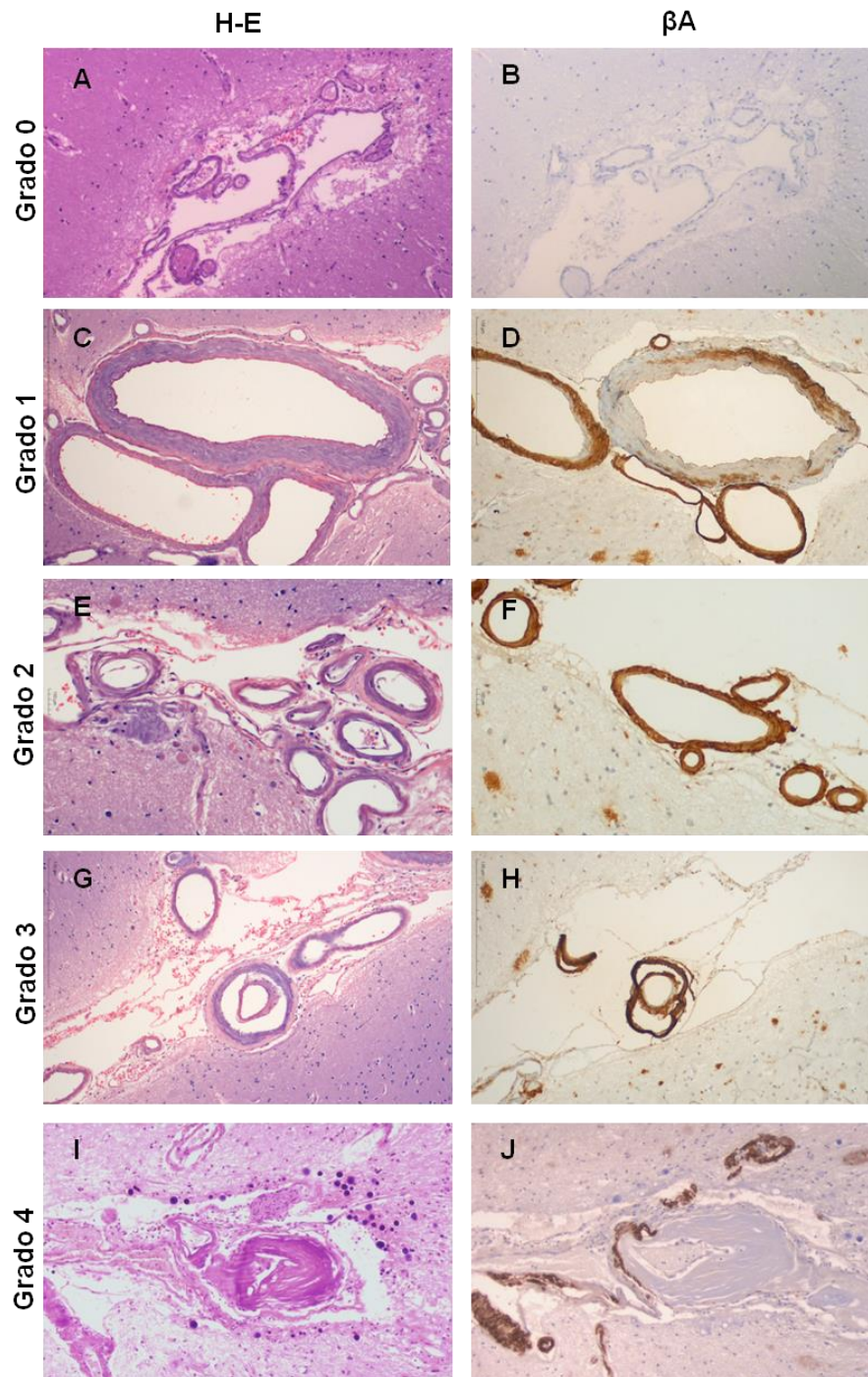


Fig. 2. Escala de Vonsattel modificada por Greenberg de afectación vascular por angiopatía amiloide. **Grado 0:** no se observa afectación vascular con H-E (A) ni con β A (B). **Grado 1:** en la H-E no se identifican alteraciones morfológicas (C), pero sin embargo se encuentra depósito de β A en el estudio inmunohistoquímico (D). E y F: Ejemplos de **grado 2** con engrosamiento y rigidez de los vasos en la H-E y β A positivo. G y H: Ejemplos de **grado 3** con imágenes de doble carril en la H-E y β A positivo. I y J: Ejemplos de **grado 4** con un vaso que muestra necrosis fibrinoide en la H-E. Sin embargo, en este mismo vaso se observa un mínimo depósito de β A debido a que la mayoría de la pared presenta una necrosis fibrinoide. A y B, C y D, E y F, G y H, I y J son imágenes de cortes consecutivos. 100x.

1.3. Diagnóstico y tratamiento de la AAC

Para el diagnóstico de la AAC se utilizan los criterios clínicos presentados en 2001¹⁹ y modificados en 2010²⁰. Se conocen como los criterios diagnósticos de Boston y encontramos las siguientes categorías:

- AAC definitiva: cuando tras la autopsia se demuestra que hay una hemorragia lobar, cortical o córtico-subcortical con demostración histológica de vasculopatía por AAC severa¹⁵ y ausencia de otras causas de hemorragia (como tratamiento anticoagulante excesivo definido como Índice Internacional Normalizado o INR ≥ 3.0 , antecedente de traumatismo cráneo-encefálico, ictus cerebral con transformación hemorrágica, tumor cerebral con hemorragia, malformación vascular, vasculitis y discrasia sanguínea o coagulopatía (INR ≥ 3.0 u otra anomalía analítica no específica de una posible AAC).
- AAC probable con datos clínicos y patológicos (biopsia cortical o hematoma evacuado) que lo apoyen demostrando que hay una hemorragia lobar, cortical o cortico-subcortical junto a vasculopatía por AAC de cualquier grado¹⁵ y ausencia de otras causas de hemorragia.
- AAC probable con datos clínicos (edad ≥ 55 años) y radiológicos (RM o TAC cerebral) que lo apoyen evidenciando múltiples hemorragias limitadas a regiones lobar, cortical o córtico-subcortical en ausencia de otras causas de hemorragia; o bien, una hemorragia única con las características descritas junto con siderosis superficial cortical focal (≤ 3 surcos) o diseminada (≥ 4 surcos) y ausencia de otras causas de hemorragia o siderosis.
- AAC posible con datos clínicos de edad ≥ 55 años y radiológicos que demuestren hemorragia lobar, cortical o córtico-subcortical única en ausencia de otras causas de hemorragia, o bien siderosis cortical focal y diseminada en ausencia de otras causas.

Respecto al tratamiento de la AAC, éste se limita a intentar reducir las consecuencias clínicas de la HIC y su recurrencia. Para ello, se recomienda un control estricto de la presión arterial incluso a través de tratamiento con antihipertensivos²¹ y evitar tratamiento con anticoagulantes por el riesgo de recurrencia de la HIC²². En pacientes con antecedentes de ictus isquémico por fibrilación auricular y posible AAC, puede ser recomendable el uso de anticoagulantes orales de nueva generación²³. El papel de las estatinas como tratamiento en estos pacientes es conflictivo, ya que, aunque puede presentar beneficios en cuanto a la prevención de la enfermedad cardiovascular, se ha descrito riesgo de recurrencia de HIC. Por el momento, no se recomienda evitar su uso en pacientes con AAC²³.

Se han realizado pocos ensayos clínicos en pacientes con AAC. Uno de ellos estudió el Ponezumab (PF-04360365, Pfizer), anticuerpo monoclonal dirigido al extremo C-terminal del A β 40 que mostró eficacia reduciendo los depósitos de AAC en un modelo transgénico de EA y AAC, mientras que no se observaron diferencias entre placebo y este fármaco en un ensayo clínico con humanos^{23, 24}. Hasta la fecha, no hay un tratamiento específico para pacientes con AAC.

2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1. Epidemiología y clínica

La demencia es un síndrome que se caracteriza por un deterioro cognitivo que afecta la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria²⁵. Se estima que hay más de 50 millones de personas que viven con demencia en todo el mundo, una cifra que se considera que alcanzará los 152 millones en 2050²⁶. La EA es su causa más común y supone un 60-70% de los casos²⁷. Menos de la mitad corresponden a EA pura mientras que la mayoría son demencias mixtas en las que se identifica EA acompañada de otras enfermedades

neurodegenerativas como la demencia vascular, la enfermedad con cuerpos de Lewy (demencia de cuerpos de Lewy o enfermedad de Parkinson), la demencia frontotemporal lobar o la esclerosis hipocampal²⁸. Su prevalencia entre los 65-69 años es de aproximadamente 1 por cada 100 individuos, doblando a 2 por cada 100 individuos a los 70 años²⁹. La mayoría de los casos de EA son esporádicos (>95%), y se presentan a una edad tardía (80-90 años)³⁰. Sólo en un 1% de los casos se han encontrado mutaciones hereditarias en las que la enfermedad aparece a una edad más temprana. Dichas mutaciones afectan a genes implicados en el procesamiento de β A como son los genes *APP* (proteína precursora del amiloide), *PSEN1* (presenilina 1) o *PSEN2* (presenilina 2)³¹.

La EA es una enfermedad crónica con una larga fase preclínica y prodrómica de unos 20 años, en la que el deterioro cognitivo es leve, y una fase clínica o sintomática de unos 8 a 10 años, en la que el paciente muestra claros signos de demencia³². El déficit de memoria reciente es lo más característico, mientras que la memoria a largo plazo se encuentra preservada. Los pacientes con EA pueden presentar problemas en el lenguaje relacionados con la dificultad para encontrar palabras al expresarse o incluso afasia, defectos espacio-visuales como perderse en lugares familiares o dificultad en encontrar objetos, una menor agilidad mental y dificultad en la atención y en la resolución de problemas³³⁻³⁵.

Recientemente, el estudio de biomarcadores mediante el análisis del líquido céfalo-raquídeo (LCR) y de imagen pueden ayudar en el diagnóstico clínico de la EA independientemente de la sintomatología de los pacientes. Una baja presencia de β A42 en el LCR o una tomografía por emisión de positrones (PET) positiva para amiloide se relacionan con cambios patológicos de EA^{36, 37}. La demostración adicional de pTau en LCR o PET positivo para tau sería necesaria para el diagnóstico de EA, ya que el depósito de amiloide y de tau son los dos biomarcadores de esta entidad. Otros signos de daño neuronal incluirían el aumento de tau total en LCR, atrofia cerebral en

el estudio de RM o hipometabolismo en fluorodesoxiglucosa (FDG) que junto al PET pueden añadir información del estadio de gravedad de los cambios patológicos de la EA³⁸⁻⁴⁰. Por el momento, estos análisis se utilizan principalmente con fines de investigación y su uso clínico está reservado para cuadros clínicos atípicos que no permitan un diagnóstico fiable de EA³⁶.

Debido a que otras demencias pueden confundirse clínicamente con EA y que muchos de los casos de EA no son puros, el diagnóstico patológico continúa siendo el *gold standard* para su correcta clasificación. Por otro lado, se puede encontrar patología de tipo Alzheimer en autopsias de pacientes sin síntomas de demencia o con leve deterioro cognitivo que no cumplen por completo los criterios diagnósticos de EA^{30, 41}.

2.2. Hallazgos neuropatológicos

2.2.1. Hallazgos macroscópicos

Los cerebros de pacientes con EA muestran una atrofia cortical fronto-temporal, más marcada en el área límbica, con preservación del área motora y somatosensorial⁴². Como consecuencia, hay una dilatación ventricular (Fig.3), con adelgazamiento del cuerpo calloso, y una disminución del peso del cerebro. También es común observar una disminución del pigmento de neuromelanina en el locus coeruleus de la protuberancia⁴¹. Ninguno de estos hallazgos por separado es específico de la EA, pero pueden ser sugestivos cuando no se identifican signos de otras enfermedades neurodegenerativas³¹.



Fig. 3: Fotografías macroscópicas de un cerebro con patología de Alzheimer. **A.** Vista lateral de hemisferio derecho, tras retirar leptomeninges. Se observa una marcada atrofia cerebral con adelgazamiento de las circunvoluciones y surcos prominentes en región fronto-temporal. **B.** Cortes coronales del mismo hemisferio en los que se observa una marcada dilatación de los ventrículos laterales, con asta inferior dilatada y adelgazamiento del hipocampo. Imagen cortesía del Dr. Alberto Rábano (Fundación CIEN, Madrid).

2.2.2. Hallazgos microscópicos

Histológicamente la EA se caracteriza por presentar placas de βA , ovillos neurofibrilares y hebras de neuropilo, acompañados de otras lesiones típicas pero no patognomónicas como la degeneración granulovacuolar y los cuerpos de Hirano.

Placas de βA

Las placas de βA están formadas por la acumulación de los péptidos $\beta A40$ y $\beta A42$ ⁴³⁻⁴⁵. Las placas más típicas de la EA son las difusas y las neuríticas (Fig. 4). Las placas difusas no muestran un *core* denso, ni se encuentran rodeadas de microglia activada y astrocitos reactivos. Las placas neuríticas presentan un *core* denso compacto de βA con un halo claro rodeado de una corona compuesta por neuritas distróficas positivas para pTau con activación microglial en contacto con el *core* y astrocitos reactivos en la periferia de la placa^{45,46} (Fig. 4). La presencia de placas neuríticas se ha relacionado estrechamente con la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo en la EA^{47,48}.

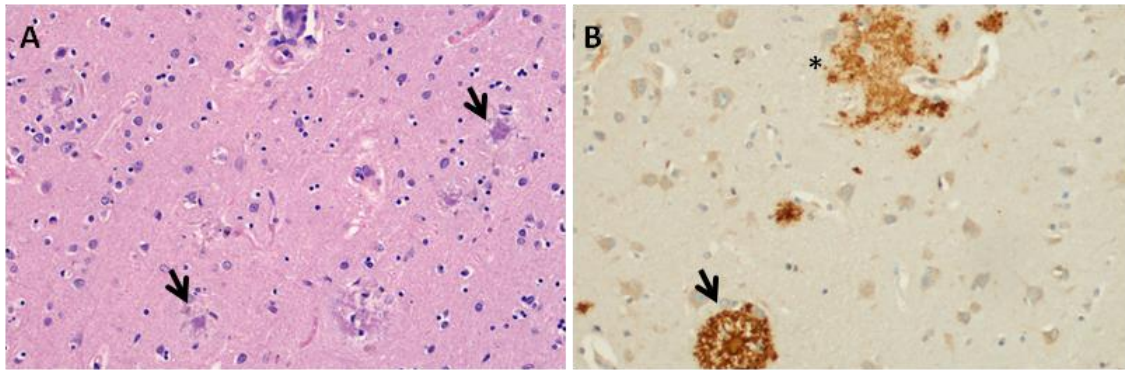


Fig. 4: Imágenes representativas de **placas neuríticas** (flecha) con **core** denso y **difusas** (asterisco) sin **core** central tanto en la hematoxilina-eosina (A) como con la técnica inmunohistoquímica para β A (B).

Ovillos neurofibrilares y hebras de neuropilo

Los ovillos neurofibrilares, que se encuentran en el citoplasma de las neuronas, están compuestos por filamentos de proteína tau que incluyen las 6 isoformas de esta proteína, incluidas las que presentan tres repeticiones (3R) y cuatro repeticiones (4R), en el dominio de unión de los microtúbulos⁴⁹. La proteína tau se encuentra anormalmente plegada e hiperfosforilada, esto hace que pierda su habilidad de unir y estabilizar los microtúbulos en el axon⁵⁰. La pérdida de función de la proteína anómala se suma a las propiedades que adquiere para aumentar su agregación⁵¹. Las hebras de neuropilo presentan los mismos filamentos de proteína tau anómala en las dendritas y axones procedentes de neuronas que contienen ovillos neurofibrilares. Se ha descrito en la EA que la mayor carga de pTau se encuentra en las hebras de neuropilo⁵²⁻⁵⁴.

El depósito de Tau fosforilada (pTau), tanto en forma de ovillos neurofibrilares como de hebras de neuropilo, se ha relacionado con muerte neuronal y declive cognitivo en la EA. En concreto, el número y localización de éstos se correlaciona con pérdida neuronal y gravedad de la enfermedad⁵⁵⁻⁵⁶. De hecho, se ha reportado que los ovillos neurofibrilares se asocian más al deterioro cognitivo que la presencia de placas neuríticas⁵⁷.

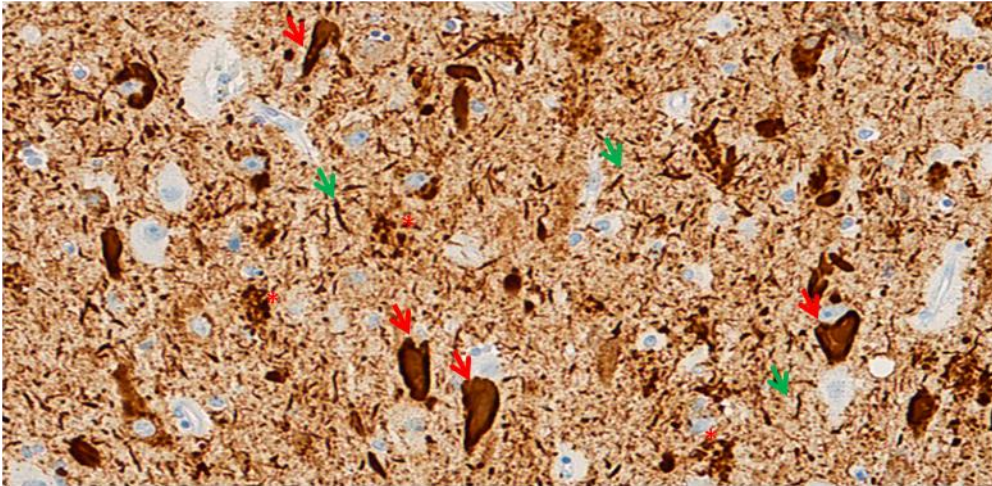


Fig. 5: Imagen histológica del hipocampo en la que se observan ovillos neurofibrilares (flecha roja), neuritas distróficas (flecha verde) y hebras de neuropilo (asterisco) con la técnica inmunohistoquímica Tau-AT8. 200x.

Degeneración granulovacuolar y cuerpos de Hirano

La presencia de vacuolas intracitoplasmáticas en las neuronas piramidales del hipocampo define la degeneración granulovacuolar. Los cuerpos de Hirano son inclusiones eosinófilas en las dendritas neuronales que típicamente se encuentran en la región CA1 del hipocampo. La degeneración granulovacuolar y los cuerpos de Hirano no son específicos de EA, ya que, se pueden observar tanto en la EA como en otras enfermedades neurodegenerativas e incluso en personas sin patología neurodegenerativa. Su papel en la EA no ha sido totalmente dilucidado, aunque son más frecuentes en la EA que en personas sin demencia⁶⁰.

Por lo tanto, únicamente la acumulación extracelular de β A en el núcleo de la placa neurítica y la acumulación intracelular de pTau en forma de ovillos neurofibrilares y hebras de neuropilo se consideran las dos firmas moleculares y morfológicas de la EA⁶¹.

2.3. Concepto de taupatía

La presencia de depósitos de pTau en el cuerpo o en los procesos de las neuronas y las células gliales definen una taupatía. La proteína tau presenta seis isoformas que difieren entre sí por la presencia o ausencia de insertos de 29 o 58 aminoácidos en la

porción N-terminal y por la presencia de tres o cuatro secuencias de repetición (3R o 4R) en tándem de 31 o 32 aminoácidos. En el cerebro humano normal, se encuentran niveles similares de las isoformas 3R y 4R. Las taupatías se clasifican según el predominio de alguna de estas isoformas o si se encuentran en la misma proporción⁶²⁻⁶³. La enfermedad de Pick (EPI) es una taupatía primaria 3R que puede mostrar una patología similar a la EA, con unas lesiones patognomónicas, los cuerpos de Pick (inclusiones neuronales intracitoplasmáticas esféricas). Además, en esta entidad se identifican astrocitos ramificados en forma de espina y pequeñas inclusiones globulares oligodendrogliales⁶⁴. La parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la degeneración córticobasal (DCB) son taupatías primarias 4R que presentan diferentes topografías y cambios patológicos, aunque puede existir cierta superposición en la distribución regional. La patología de la PSP es predominante en el rombencéfalo y sus hallazgos característicos incluyen depósitos de pTau neuronales (ovillos globosos) y astrocíticas (astrocitos “en penacho”). La patología de la DCB predomina en el prosencéfalo y se caracteriza principalmente por la positividad de pTau astrocítica (placas astrocíticas). Tanto la PSP como la DCB exhiben preovillos en neuronas y “cuerpos espirales” en células oligodendrogliales³⁹. Desde el punto de vista clínico, estas enfermedades pueden presentarse con cuadros de tipo demencia frontotemporal o parkinsonismo atípico⁶⁵.

En el caso de la EA, se considera que se trata de una taupatía secundaria, ya que se caracteriza no sólo por depósito de pTau sino también por depósito de β A. A diferencia del resto de las taupatías primarias, el depósito de tau se encuentra exclusivamente en la neurona y, además, presenta una proporción similar de las isoformas 3R y 4R⁶⁴.

2.4. Diagnóstico y tratamiento de la EA

Actualmente para el diagnóstico de la EA se utilizan las guías del National Institute of Aging and Alzheimer’s Association (NIA-AA). Una de ellas se utiliza para el diagnóstico clínico (NIA-AA 2011⁶⁶) y la otra para el diagnóstico neuropatológico (NIA-AA 2012⁶⁷).

La guía de diagnóstico clínico (NIA-AA 2011⁶⁶) cubre los 3 estadios de la EA: Fase preclínica (que se utiliza únicamente en el ámbito de investigación y se basa en la detección del depósito de amiloide mediante el PET o análisis del LCR en pacientes asintomáticos), deterioro cognitivo leve (en este escenario los pacientes presentan problemas de memoria que no les impiden llevar una vida normal y se les realizan estudios de RM y/o de biomarcadores en LCR y PET) y EA (en esta fase la pérdida de memoria se acompaña de otros problemas que impiden al paciente llevar una vida normal y el estudio de biomarcadores está limitado a casos en los que hay duda del diagnóstico de la EA).

El diagnóstico definitivo de la EA requiere el análisis del cerebro post-mortem. Para ello se utiliza la guía de diagnóstico neuropatológico⁶⁷ que tiene en cuenta que la patología de tipo Alzheimer puede estar presente sin evidencia de demencia clínica y también considera la presencia concomitante de demencia de cuerpos de Lewy, de enfermedad vascular y/o esclerosis hipocampal entre otras comorbilidades. Para ello se gradúa por un lado la distribución anatómica de las placas (fases de Thal⁶⁸), por otro la distribución del depósito de pTau (estadios de Braak⁶⁹) y, finalmente, la densidad de placas neuríticas (criterio de CERAD⁷⁰).

En la Fase 1 de Thal⁶⁸, las placas de β A se encuentran únicamente en neocórtex frontal, parietal, temporal u occipital. En la fase 2, además se observan en la región entorrinal e hipocampo. En la fase 3, éstas se extienden a los ganglios de la base. En la fase 4, alcanzan varios núcleos del troncoencéfalo (incluido el mesencéfalo) y en la 5, el cerebelo y el resto de estructuras del troncoencéfalo como el núcleo pontino y el locus coeruleus (Fig. 6).

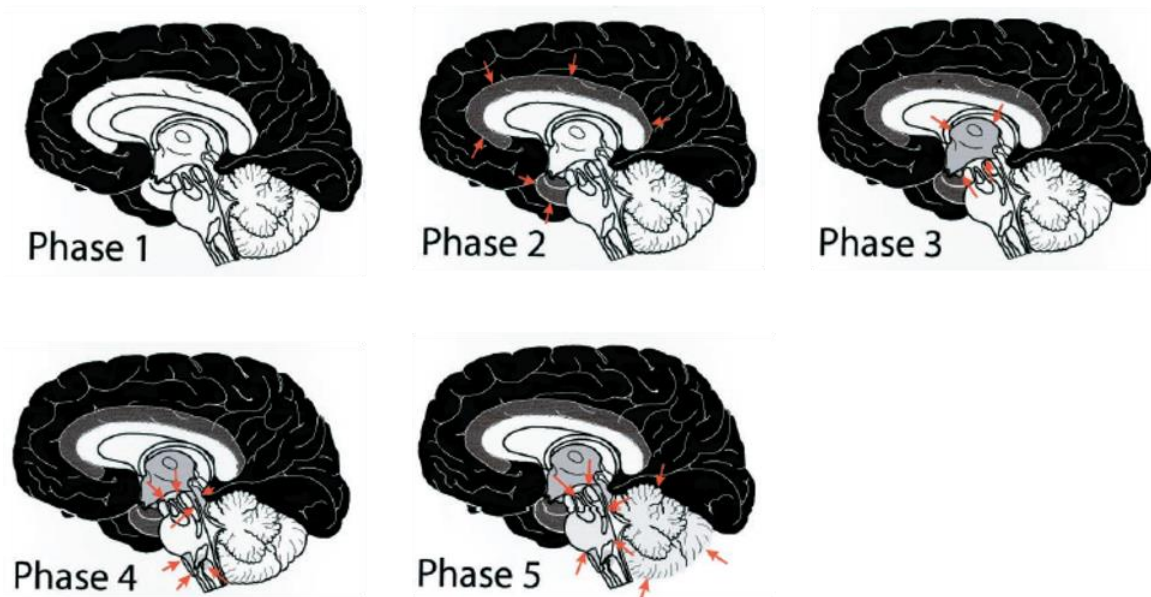


Fig. 6: Esquema de las fases de Thal. Las flechas rojas indican la extensión de las placas de βA según cada fase. Imagen extraída del artículo de Thal et al. 2002⁶⁸.

El estadiaje de Braak⁶⁹ se basa en la localización de la patología neurofibrilar (PNF) que incluyen ovillos neurofibrilares y hebras de neuropilo. En el estadio I de Braak se encuentra PNF de al menos baja densidad en la corteza transentorrinal y en el II, ésta se extiende a la corteza entorrinal. En el estadio III, se observa una densidad al menos moderada de PNF en el giro occipito-temporal, adyacente a la región transentorrinal, y en el estadio IV, en el giro temporal medio. En el estadio V, se identifica una densidad al menos moderada de PNF en la región periestriada y en el VI, en la capa V del área estriada (Fig. 7).

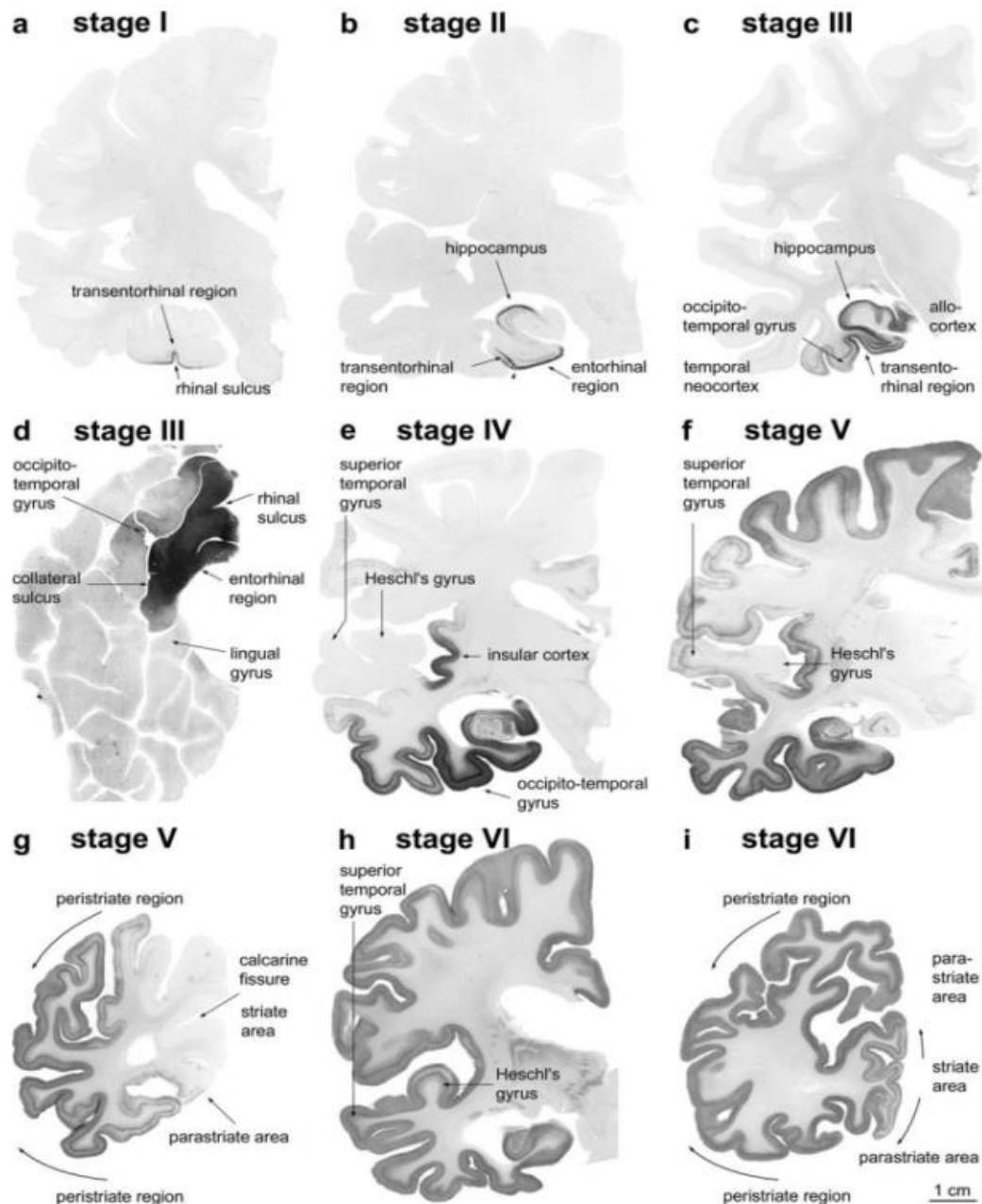


Fig. 7: Ejemplos de los estadios de Braak. El depósito y extensión de pTau está marcado con negro y gris. Imagen extraída del artículo de Braak et al. 2006⁶⁹.

El criterio del CERAD⁷⁰ se realiza mediante una evaluación semicuantitativa de las placas neuríticas en corteza frontal, parietal y temporal en un campo de 100x de la que se extraen 4 categorías: Ausentes (no se detectan placas), escasas (<7 placas por campo), moderadas (de 7 a 20 placas por campo) y frecuentes (>20 placas por campo).

Con estos tres sistemas de gradación modificados se obtiene una puntuación ABC⁶⁷ (Amiloide, Braak, CERAD):

A. El A se corresponde con las fases de placas de β A descritas por Thal⁶⁸:

- **A0**: ausencia de placas de β A
- **A1**: Fases de Thal 1 y 2
- **A2**: Fase de Thal 3
- **A3**: Fases de Thal 4 y 5

B. El B se obtiene de la valoración de la PNF según el estadio de Braak⁶⁹:

- **B0**: ausencia de PNF
- **B1**: Estadío de Braak I o II
- **B2**: Estadío de Braak III o IV
- **B3**: Estadío de Braak V o VI

C. El C sigue el consenso de CERAD⁷⁰ que valora la densidad de placas neuríticas:

- **C0**: ausencia de placas neuríticas
- **C1**: Score CERAD escasas
- **C2**: Score CERAD moderadas
- **C3**: Score CERAD frecuentes

Al integrar los datos se obtiene una probabilidad baja, intermedia o alta de EA⁶⁷, tal como refleja la siguiente tabla:

A	C	B0 O B1	B2	B3
A0	C0	NO	NO	NO
A1	C0 O C1	BAJA	BAJA	BAJA
A1	C2 O C3	BAJA	INTERMEDIA	INTERMEDIA
A2	CUALQUIER C	BAJA	INTERMEDIA	INTERMEDIA
A3	C0 O C1	BAJA	INTERMEDIA	INTERMEDIA
A3	C2 O C3	BAJA	INTERMEDIA	ALTA

Respecto a los tratamientos disponibles para la EA, existen fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (Ej: Donezepilo, Galantamina) que favorecen la presencia del neurotransmisor acetilcolina en la hendidura sináptica⁷¹ y el fármaco Memantina, un antagonista no competitivo de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)⁷²⁻⁷³ que muestran una eficacia leve en la mejora del estado cognitivo. Por otra parte, las intervenciones psicosociales en los enfermos de EA también pueden tener un efecto beneficioso en la sintomatología de los pacientes⁷³. No obstante, estos tratamientos tratarían los síntomas de la EA pero no modificarían el curso natural de la enfermedad.

A diferencia de la AAC, en la EA actualmente hay más de 100 compuestos diferentes en varias fases de ensayo clínico⁷⁴. Algunos ejemplos son terapias dirigidas contra β A, como la inmunización y la inhibición de la γ - o β -secretasa aunque no han demostrado una mejora relevante del estado cognitivo hasta el momento. También hay ensayos basados en terapias dirigidas contra Tau o contra APOE e incluso terapias combinadas⁷⁵. Todavía está por ver si alguno de estos ensayos conseguirá modificar o evitar la progresión de la enfermedad. Mientras tanto, la investigación clínica y básica de las vías patogénicas de la EA es necesaria para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

3. INTERACCIÓN ENTRE AAC Y EA

Numerosos estudios sugieren que el deterioro cognitivo en el cerebro anciano típicamente presenta un solapamiento entre patologías neurodegenerativas y vasculares⁷⁶. La enfermedad neurodegenerativa más frecuente sería la EA (presente en el 65% de los casos), y las etiologías vasculares más frecuentes serían grandes infartos isquémicos, AAC de moderada a grave, aterosclerosis y arterioesclerosis, cada una de ellas presente en más del 30% de los casos⁷⁷.

La disfunción cerebrovascular, que es una de las primeras anomalías observadas en la AAC, también se ha identificado en la patogénesis de la EA⁷⁸. Además, la atrofia cerebral no sólo es un marcador neuroradiológico de EA sino que también es una característica de la enfermedad cerebrovascular, entre las que se incluye la AAC⁷⁹. Por otro lado, el depósito de pTau no es una característica propia de la AAC como sí que lo es de la EA, pero se ha observado su presencia alrededor de los vasos cargados de β A tanto en la AAC esporádica como en la hereditaria⁸⁰. La presencia concomitante de la EA y una AAC avanzada se asocian a un deterioro cognitivo más grave⁸¹ y más rápido⁸².

El principal punto en común entre la AAC y la EA es el depósito de β A. Como se ha descrito anteriormente, en la AAC este depósito se localiza en las paredes vasculares, mientras que en la EA se encuentra en el parénquima en forma de placas neuríticas. Las vías involucradas en el aclaramiento del β A soluble cerebral son el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE), la fagocitosis, la degradación enzimática y el drenaje perivascular⁸³. No se conoce con exactitud el papel que tienen cada una de estas vías en la eliminación de β A del cerebro, aunque se cree que el drenaje perivascular anómalo sería el factor más importante en la patogenia de la AAC y la EA⁸⁴. Estudios con trazadores de las vías de drenaje del β A han sugerido que el fluido intersticial viajaría alrededor de los capilares y sería eliminado del cerebro a través del drenaje peri-arterial intramural (IPAD) entre la membrana basal del músculo liso de la túnica media de arterias y arteriolas cerebrales, coincidiendo con la localización predominante del depósito vascular de β A en la AAC⁸⁵. La interrupción de estas vías causada por el depósito de β A en los vasos cerebrales podría contribuir a la reducción del aclaramiento y al aumento del depósito de β A en el parénquima, por lo que, se ha hipotetizado que el depósito vascular de β A podría exacerbar la EA⁸³.

A pesar de que el principal componente de las placas neuríticas en la EA y del depósito vascular en la AAC es el β A, la longitud de estos péptidos es diferente en

cada entidad. Los que se extienden a la terminación carboxi 42 (β A42) son los que se depositan principalmente en las placas neuríticas mientras que los más cortos, β A40, predominan en las paredes arteriales leptomeníngicas y corticales y, ocasionalmente, venosas en la AAC⁸⁶⁻⁸⁸. Éstos también contienen β A42 pero el ratio β A40: β A42 es más alto que en las placas neuríticas. Sin embargo, el ratio β A40: β A42 en los depósitos capilares es más bajo que en las arterias y las venas, siendo equivalente al de las placas neuríticas⁸⁹⁻⁹⁰. El hecho de que β A42 sea más insoluble y forme fibrillas más rápido que péptidos más cortos de β A, facilita el depósito parenquimatoso e iniciaría la nucleación de la placa⁹¹. En cambio, el β A40, más soluble, se difunde mejor por el espacio perivascular depositándose en las paredes vasculares⁹².

Mutaciones hereditarias en *APP* que flanquean la región que codifica β A, generalmente aumentan los niveles totales de β A42 y predisponen a la formación de placas neuríticas y a fenotipos asociados a EA de inicio temprano⁹³. Por el contrario, mutaciones en el interior o fuera de la región codificante inducen un fenotipo prominente de AAC⁹⁴. Además, se ha observado depósito vascular prominente de β A en algunos pacientes con EA familiar que presentaban mutación en *PSEN1* o *PSEN2*⁹⁵⁻⁹⁷. Por otro lado, parece ser que mutaciones en posiciones más allá del codón 200 darían un fenotipo más severo de AAC que las mutaciones por delante de este codón⁹⁸.

Finalmente, cabe señalar que la presencia de β A en las placas neuríticas y en las paredes vasculares se acompaña del depósito de otras proteínas entre las que se incluyen proteínas del complemento, el complemento amiloide sérico P, α 1-antiquimotripsina, glicosaminoglicanos, matriz metaloproteínica 9 (MMP9), así como ciertas apolipoproteínas⁹⁹⁻¹¹⁰. No se conoce cómo, cuándo ni a qué concentración se codepositan estas proteínas con el β A, pero se ha descrito que algunas de éstas pueden acelerar o inhibir la formación de fibrillas de β A¹¹¹⁻¹¹⁵. Tampoco se conoce si la

expresión o presencia de proteínas unidas al β A podría condicionar la localización de estos depósitos en el cerebro.

4. APOLIPOPROTEÍNAS Y β -AMILOIDOSIS CEREBRAL

Las apolipoproteínas, más allá de su papel natural en el metabolismo del colesterol, se ha propuesto que podrían estar involucradas en el transporte y eliminación de β A en el cerebro¹¹⁶⁻¹¹⁷. Éstas son el componente proteico de la envoltura de las lipoproteínas, que transportan clásicamente el colesterol esterificado y triglicéridos de los tejidos al hígado. Algunas de estas proteínas, en concreto las más expresadas en el cerebro como la apolipoproteína E (ApoE), la apolipoproteína J (ApoJ) [también conocida como clusterina (CLU)] y la apolipoproteína mayoritaria en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) circulantes (ApoA-I), se han relacionado con la β -amiloidosis cerebral. Sin embargo, hasta la fecha su presencia y función en el cerebro no están bien definidas.

4.1. APOE

En 1993, el gen *APOE*, en especial la isoforma $\epsilon 4$, se identificó como factor de alto riesgo para la EA y la AAC esporádicas o de inicio tardío¹¹⁸. Los diferentes alelos de *APOE* se han relacionado con diferentes fenotipos. Por un lado, *APOE* $\epsilon 4$ se asocia con la cantidad de amiloide vascular y de placas neuríticas¹¹⁹. Por otro, *APOE* $\epsilon 2$ parece ser un factor protector frente a la EA¹²⁰, pero es un factor de riesgo de ocurrencia de HIC en la AAC¹²¹⁻¹²⁴. Hasta el momento, ningún otro locus relacionado con la EA se ha identificado en casos de AAC¹²⁵.

La proteína ApoE se produce por la glia (astrocitos y microglía), pericitos, células de músculo liso de los vasos y, en menor medida, por neuronas bajo ciertas condiciones de estrés y por las células endoteliales del cerebro. Varios estudios basados en técnicas inmunohistoquímicas demostraron la presencia de depósitos vasculares y

parenquimatosos de ApoE que colocalizaban con los de $\beta A^{48, 106, 116}$. ApoE modula múltiples vías que afectan a la función cognitiva, incluyendo la homeostasis del colesterol y lípidos, la función sináptica, el metabolismo de la glucosa, la neurogénesis, la función mitocondrial, la fosforilación de tau, la atrofia neuronal, la neuroinflamación y el metabolismo y agregación del βA^{126} . Además, se ha propuesto que ApoE podría modular la salida de βA a través de la BHE mediante el receptor LRP1¹²⁷, mientras que otros estudios han demostrado que la interacción entre ApoE y βA es casi nula en condiciones fisiológicas y la única manera en la que ApoE podría eliminar el βA sería compitiendo por la unión a LRP1 en los astrocitos¹²⁸. En modelos murinos de EA, la inactivación de este gen provocó una disminución de los depósitos de βA con ausencia completa de placas de amiloide y neuritas distróficas¹²⁹, sin embargo, la expresión de ApoE humana en los mismos modelos, tanto deficientes o no de ApoE murina, retrasó de forma significativa el depósito de βA cerebral¹³⁰. Otros modelos experimentales han sugerido que ApoE tiene un papel en la desestabilización y alteración de los vasos cerebrales, hecho que favorecería el depósito de $\beta A^{131-132}$. A pesar de que ApoE parece tener una influencia significativa en el depósito de βA , el mecanismo subyacente es complejo y sigue bajo investigación.

4.2. Otras apolipoproteínas

ApoJ es una proteína heterodimérica multifuncional que se produce en el cerebro por la glía, siendo la segunda apolipoproteína más expresada en cerebro tras la ApoE. Una de las funciones principales de ApoJ es su rol como chaperona natural, uniéndose a proteínas con un plegamiento defectuoso y previniendo su agregación. De esta forma, se han detectado complejos ApoJ- βA en LCR y plasma¹¹¹. Al igual que ApoE, también se ha demostrado que ApoJ codeposita con βA en lesiones cerebrovasculares y parenquimatosas^{106, 133-134}. El papel de ApoJ en la β -amiloidosis cerebral se identificó gracias a estudios de asociación en el genoma completo (GWAS) en los que se encontró una asociación estadística entre un único polimorfismo de

nucleótidos dentro del gen *CLU* y el riesgo de sufrir EA⁶. Se ha descrito además una asociación entre el genotipo *CLU* y los depósitos de β A determinados mediante imágenes de PET¹³⁵, y el aumento plasmático de ApoJ se ha asociado con una mayor prevalencia y gravedad en la EA¹³⁶. Por otro lado, se ha postulado que el aumento de los niveles de ApoJ circulantes puede ser una respuesta protectora contra la acumulación aberrante de β A en el cerebro¹³⁷. De hecho, la variante genética rs11136000C en el gen *CLU*, provoca una menor expresión de ApoJ y se ha identificado como un factor de riesgo para padecer EA, mientras que la variante rs11136000T genera mayor expresión de la proteína y se ha identificado como una variante protectora¹³⁸⁻¹⁴¹.

ApoA-I es un componente importante de las HDL en plasma y desempeña un papel crucial en el transporte inverso de colesterol. Se produce principalmente en el hígado y el intestino, encontrándose principalmente circulando en sangre, aunque también se ha detectado en LCR¹⁴² y en el parénquima cerebral¹⁴³. Por un lado, *APOA1* se ha descrito como factor de riesgo de EA, en concreto el polimorfismo *G75A* que se asocia también con el deterioro cognitivo¹⁴⁴⁻¹⁴⁵, y además la presencia de ApoA-I se ha descrito en algunos depósitos cerebrales de β A¹⁰⁶. En enfermos de EA se han detectado niveles circulantes de ApoA-I en suero y plasma inferiores a los de personas sanas¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ y en pacientes con deterioro cognitivo leve, se han relacionado niveles circulantes de ApoA-I más bajos en plasma y más altos en LCR con aumento del riesgo de progresión de la demencia, especialmente en pacientes portadores del alelo *APOE ϵ 4*¹⁴⁹. Respecto a la AAC, los niveles circulantes de ApoA-I se han correlacionado con niveles plasmáticos de β A40¹⁵⁰, sugiriendo un posible papel de ApoA-I en el transporte de β A circulante.

Por otra parte, ApoA-I es capaz de unirse a β A40 formando complejos estables previniendo su agregación y citotoxicidad in vitro^{27, 151-152}. Un estudio en el que se administró un péptido mimético de ApoA-I junto a estatinas en un modelo murino de EA (*APP/PS1*) mostró una mejoría del deterioro cognitivo y de la carga amiloide

cerebral, así como una bajada en los marcadores de neuroinflamación¹⁵³. Además, ratones del modelo APP/PS1 deficientes para ApoA-I presentaron un mayor deterioro de la función cognitiva que no se pudo explicar por un cambio en la carga de amiloide cerebral, aunque sí se observó un aumento de los depósitos de amiloide a nivel vascular¹⁵⁴. Por otro lado, la sobreexpresión de ApoA-I en el modelo murino APP/PS1 se tradujo en una prevención del deterioro cognitivo, sin efecto sobre el depósito de β A cerebral aunque se observó una disminución del depósito de β A vascular¹⁵⁵. Estos estudios sugieren que ApoA-I podría tener un papel protector en la β -amiloidosis cerebral, especialmente en la AAC.

5. CD2AP Y EA

Diferentes estudios GWAS han permitido identificar variaciones genéticas en numerosos loci asociados con el riesgo de EA. Estas variantes se encuentran en genes implicados en el transporte del colesterol (como *ABCA7*, *APOE4* e *INPP5D*), relacionados con el aclaramiento de las proteínas por células inmunes (como *TREM2* y *CLU*) e involucrados en el transporte endocítico y lisosómico (como *BIN1*, *CD2AP*, *PICALM*, *RIN3*, *SORL1*, *GRN* y *PLD3*)¹⁵⁶⁻¹⁶⁰.

La proteína asociada a CD2 (*CD2AP*) es una proteína multidominio de andamiaje implicada en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Inicialmente se describió como una proteína involucrada en la activación de las células T con efecto estabilizador de la interacción entre las células T y las células presentadoras de antígenos¹⁶¹. *CD2AP* contiene un dominio en espiral y tres dominios de homología Src 3 (SH3) que sirven como sitios de unión para otras proteínas¹⁶² y facilitan su papel en la remodelación dinámica de la actina y el tráfico a través de las membranas durante la endocitosis y la citocinesis¹⁶³. *CD2AP* se expresa principalmente en los podocitos glomerulares, que componen la barrera de filtración de proteínas del riñón. De hecho su importancia en la función renal se confirmó en estudios con ratones que carecían del gen *CD2AP*, y desarrollaban un síndrome nefrótico congénito¹⁶² debido al papel de esta proteína en la estructura conocida como diafragma de hendidura o diafragma de

filtración¹⁶⁴. En este sentido, se ha relacionado la presencia de mutaciones de este gen en humanos (en las que el producto es una proteína CD2AP truncada), con síndrome nefrótico y glomeruloesclerosis focal y segmentaria en niños^{157, 165-166}. Curiosamente una de estas mutaciones se identificó en un adulto joven con glomeruloesclerosis focal y segmentaria y demencia leve¹⁶⁷ pero hasta el momento no se han descrito las consecuencias neurológicas a largo plazo de la haploinsuficiencia de CD2AP en adultos portadores de mutaciones en este gen. En cuanto a la distribución de esta proteína, se ha descrito su expresión inmunohistoquímica en células epiteliales y en el endotelio de diferentes órganos (incluido el sistema nervioso central¹⁶⁸⁻¹⁶⁹) en modelos murinos. De hecho, un estudio reciente en roedores detectó expresión de esta proteína en neuronas de Purkinje, otras neuronas del cerebelo y en neuronas corticales¹⁷⁰. En cuanto su función cerebral, se la ha propuesto una posible implicación de CD2AP con la sinapsis a través de su participación en el tráfico de vesículas^{159, 171-172}, el brote axonal¹⁷⁰ o el mantenimiento de la BHE¹⁷³.

Respecto al estudio de *CD2AP* en pacientes con EA, la presencia de diferentes polimorfismos de este gen se ha asociado a riesgo de EA de inicio temprano (rs9473117¹⁷⁴ and rs9381563¹⁷⁵) y de inicio tardío (rs9349407^{126, 177-178}, rs10948363^{160, 178-179}, rs9296559^{176, 180} and rs9349407¹⁷¹). En este contexto patológico, CD2AP se ha relacionado previamente con el metabolismo y el aclaramiento de β A. Por ejemplo, la disminución de la expresión de CD2AP en células de neuroblastoma disminuyó los niveles extracelulares de β A¹⁸¹. Además, estudios experimentales mostraron la implicación de CD2AP en el tráfico y procesamiento de APP¹⁸², y cómo su sobreexpresión inducía una reducción de los niveles de APP en neuronas al acelerar la degradación dependiente de lisosomas¹⁸³. Sin embargo, a diferencia de los efectos de CD2AP sobre la producción y liberación de β A encontrados in vitro, la pérdida de función de CD2AP en un modelo de ratón de EA in vivo no resultó afectar los niveles totales de β A o la carga de placas de amiloide¹⁸¹. A pesar de todo, en pacientes con EA, el posible papel de CD2AP en la β -amiloidosis se ve reforzado por los datos que

muestran que las variantes de CD2AP rs9349407¹⁷⁷ y rs10948363¹⁷⁹ están asociadas con una mayor carga de placas neuríticas. Paralelamente otros estudios han propuesto que la regulación de CD2AP podría estar relacionada con la toxicidad de tau y la apoptosis neuronal. En este sentido, se describió cómo la pérdida del ortólogo de mosca de *CD2AP*, *Cindr*, exacerbó la toxicidad mediada por tau en un modelo de *Drosophila*¹⁸⁴, destacando el posible papel de esta proteína en la homeostasis neuronal y la función sináptica en este modelo. En humanos, otros estudios también han sugerido un vínculo entre CD2AP y la patología tau, ya que CD2AP se detectó como un locus de susceptibilidad para los biomarcadores de tau en LCR¹⁷⁵. En resumen, más allá de las asociaciones genéticas de ciertas variantes de *CD2AP* en pacientes con EA, poco se conoce sobre la distribución cerebral de la proteína CD2AP en el contexto neuropatológico, así como su posible implicación en el desarrollo o progresión de esta enfermedad neurodegenerativa.

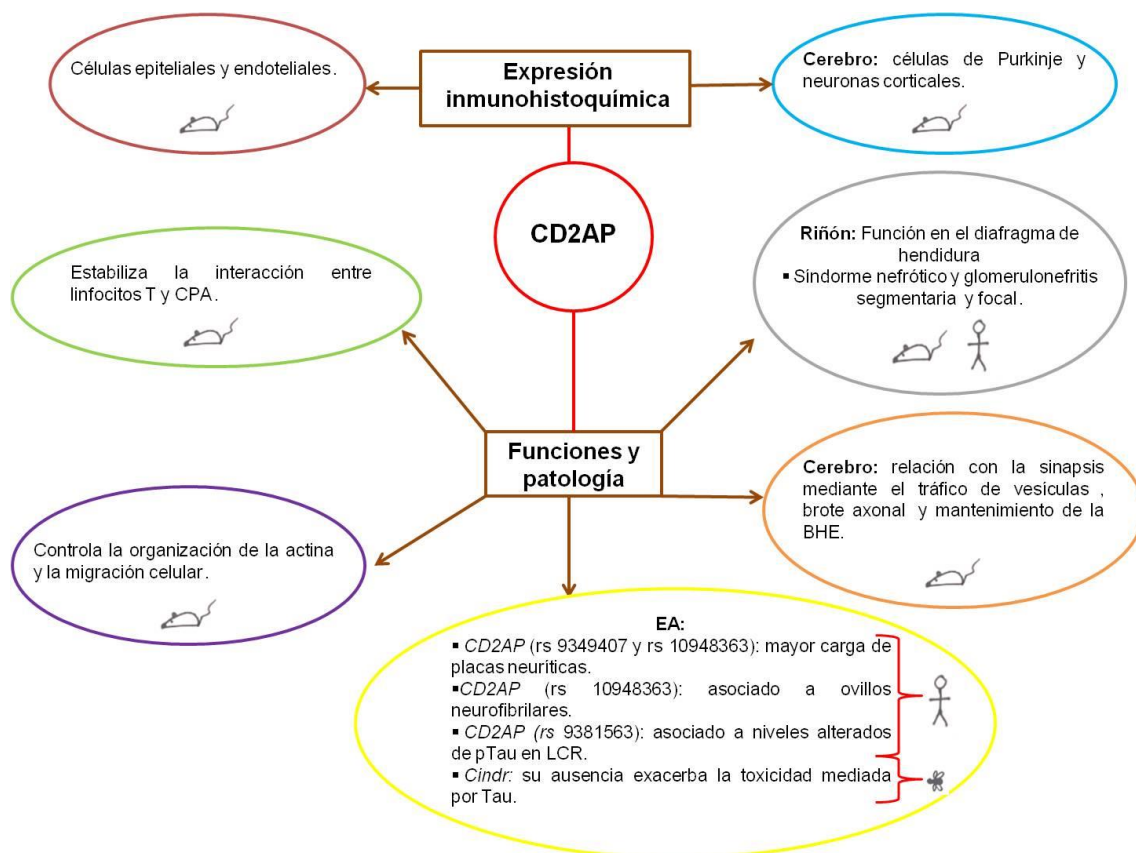


Fig. 8: Resumen de la expresión inmunohistoquímica, funciones y patología relacionada con CD2AP descritas^{64, 161-166, 168-170, 173, 175, 177-179, 184}. CPA: célula presentadora de antígeno. BHE: Barrera hemato-encefálica. Cindr: ortólogo de CD2AP de mosca.

HIPÓTESIS

La presencia de biomarcadores o la expresión de proteínas específicas en cerebro podrían definir o modular la acumulación de β A en la AAC y β A y/o pTau en la EA. Conocer la distribución anatomopatológica y localización celular de estos candidatos en el cerebro humano podría abrir vías para entender el desarrollo de estas enfermedades neurológicas, mejorar su diagnóstico y proponer nuevas opciones terapéuticas.

Esta tesis doctoral se ha centrado en buscar biomarcadores de AAC y EA llevando a cabo dos estrategias independientes:

- 1) Diferentes apolipoproteínas como la ApoE, la ApoJ y la ApoA-I se han asociado a la agregación y aclaramiento cerebral del β A. La primera hipótesis de esta tesis es que la expresión y distribución de esta familia de proteínas podrían determinar la localización del depósito de β A cerebral en placas parenquimatosas o en paredes vasculares corticales o meníngeas y capilares.
- 2) Se han descrito diferentes genes como loci de susceptibilidad genética para la EA mediante estudios de asociación del genoma completo. Entre ellos, el gen *CD2AP*, que codifica la proteína asociada a CD2 (CD2AP), de la que poco se conoce sobre su función en el cerebro. La segunda hipótesis de trabajo es la existencia de una asociación entre la expresión y distribución de CD2AP, y las características neuropatológicas de la EA.

OBJETIVOS

1) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE APOE, APOJ Y APOA-I EN LA AAC

El objetivo principal es investigar la expresión inmunohistoquímica de ApoE, ApoJ y ApoA-I en función de la presencia y localización de los depósitos de β A en corteza cerebral.

Objetivos específicos:

- 1.1. Determinar la presencia y localización de depósitos de ApoE, ApoJ y ApoA-I en tejido cerebral de pacientes con AAC tipo I, AAC tipo II, con depósitos parenquimatosos sin afectación vascular y de sujetos control.
- 1.2. Estudiar la asociación entre el depósito de ApoE, ApoJ y ApoA-I y los subtipos de AAC.
- 1.3. Estudiar la asociación entre el depósito de ApoE, ApoJ y ApoA-I y la HIC.
- 1.4. Estudiar la asociación entre el depósito de ApoE, ApoJ y ApoA-I y la HIC con el genotipo *APOE* en toda la cohorte.

2) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE CD2AP EN LA EA

El objetivo principal es analizar la distribución de CD2AP en cerebros con EA y su potencial asociación con los depósitos de β A y pTau.

Objetivos específicos:

- 2.1. Determinar la presencia y localización de depósitos de CD2AP en tejido cerebral de pacientes con EA y sujetos control.
- 2.2. Estudiar la asociación de los depósitos de CD2AP con la presencia y localización de β A y pTau (fases de Thal, estadios de Braak y criterio CERAD).
- 2.3. Identificar la presencia o ausencia de depósitos de CD2AP en otras taupatías (EPi, PSP y CBD).

MÉTODOS

A) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE APOE, APOJ Y APOA-I EN LA AAC

A.1. Selección de pacientes

Se seleccionaron 20 pacientes cuyo estudio neuropatológico post mortem se había realizado en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH). Se obtuvo consentimiento informado por escrito de todos los pacientes o de sus familiares para participar en este proyecto de investigación antes de la donación de tejido. Para los casos control, se recibió la exención del Comité de Ética del HUVH para analizarlos como muestras anonimizadas en el contexto de este estudio. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUVH (PR(IR)93/2013). Las características clínico-patológicas y causas de muerte de los pacientes se presentan en la Tabla 1. Todas las muestras se obtuvieron de 2 a 20 horas después del fallecimiento y se fijaron en formol tamponado al 10% durante 3-4 semanas. A continuación, se realizó un examen macroscópico del cerebro y se seleccionaron 27 áreas corticales y subcorticales, incluidos troncoencéfalo y cerebelo, para el diagnóstico histológico de rutina. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 4 µm y se tiñeron con H-E. Se realizaron técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpo anti-β-Amiloide de ratón (Clon 6F/3D 1: 500 (Dako, Glostrup, Dinamarca) y anticuerpo anti-Tau de ratón (Clon AT8 1:20 (Thermo Scientific, Rockford, EE.UU) en cortes representativos de los lóbulos frontal, temporal, parietal, occipital e hipocampos. La clasificación en AAC tipo I y AAC tipo II se realizó de acuerdo con los criterios descritos por Thal et al.³. Las lesiones de AAC se gradaron siguiendo los criterios descritos por Vonsattel et al.¹⁵ y modificados por Greenberg y Vonsattel¹⁶. La patología de la enfermedad de Alzheimer se evaluó y se estadificó según el estadio de Braak⁶⁹ y el criterio CERAD⁷⁰.

Caso	G	Edad	S	APOE	Braak	CERAD	Tipo AAC	Grado AAC	Causa de muerte
1	A	85-90	F	$\epsilon 4/\epsilon 3$	V-VI	C	I	II	HIC
2	A	75-80	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	IV	C	I	III	HIC
3	A	75-80	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	I	A	I	II	Adenocarcinoma de colon metastásico
4	A	70-75	M	$\epsilon 4/\epsilon 3$	II	B	I	II	HIC
5	A	80-85	M	$\epsilon 4/\epsilon 2$	-	-	I	II	HIC
6	A	75-80	M	$\epsilon 4/\epsilon 3$	III	C	I	II	Fallo cardíaco
7	B	80-85	M	$\epsilon 2/\epsilon 3$	IV	B	II	II	HIC
8	B	85-90	F	$\epsilon 2/\epsilon 3$	V-VI	C	II	IV	HIC
9	B	65-70	M	$\epsilon 3/\epsilon 3$	II	C		II	Pericarditis
10	B	90-95	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	III	C	II	I	Trombosis mesentérica
11	B	75-80	M	$\epsilon 4/\epsilon 3$	I	B	II	II	Adenocarcinoma de próstata metastásico
12	B	80-85	F	$\epsilon 2/\epsilon 3$	III	A	II	II	HIC
13	B	80-85	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	-	-	II	I	Amiloidosis sistémica secundaria
14	B	70-75	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	-	-	II	I	Carcinoma de mama metastásico
15	C	75-80	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	I	A	-	-	Meningitis aguda
16	C	55-60	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	II	C	-	-	Ictus isquémico
17	C	75-80	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	I	B	-	-	Neumonía aguda
18	D	50-55	M	$\epsilon 4/\epsilon 3$	-	-	-	-	Hipertensión pulmonar
19	D	60-65	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$	-	-	-	-	Linfoma B difuso de célula grande
20	D	70-75	M	$\epsilon 4/\epsilon 3$	-	-	-	-	Mieloma múltiple

Tabla1. Características clínico-patológicas y causa de muerte de los pacientes incluidos en el estudio. G: Grupo, S: Sexo; F: femenino; M: masculino, Grado AAC según la escala de Vonsattel modificada por Greenberg¹⁵⁻¹⁶, HIC: hemorragia intracerebral.

Los pacientes se dividieron en 4 grupos según la localización de los depósitos de β A (Fig.9): **Grupo A**, que incluía casos de AAC tipo I (6/20 casos); **Grupo B**, que contenía

casos de AAC tipo II (8/20 casos); **Grupo C**, casos con depósitos parenquimatosos de β A, sin depósito vascular (3/20 casos), y **grupo D**, casos control sin depósitos de β A (3/20 casos).

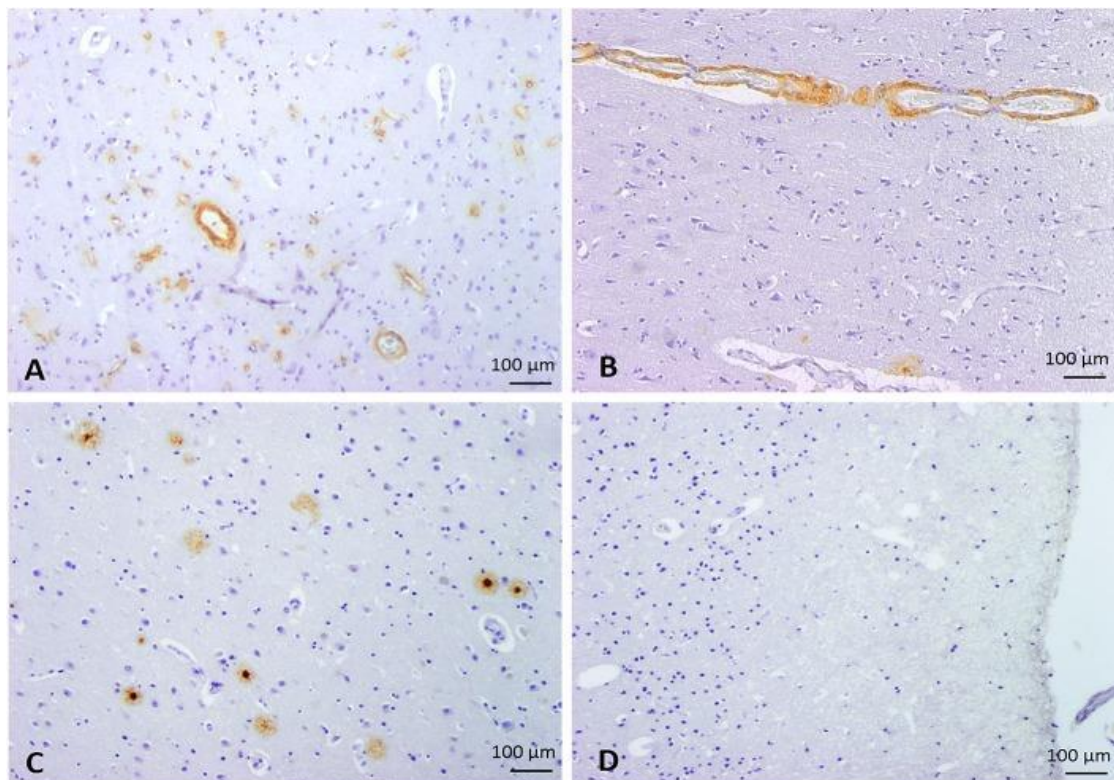


Fig. 9: Imágenes representativas de los distintos grupos realizados: **A: Grupo A:** AAC tipo I, con depósito vascular de β A capilar y arterial. **B: Grupo B:** AAC tipo II que presenta depósito de β A arterial sin evidencia de depósito capilar. **C: Grupo C** caracterizado por la presencia de depósito parenquimatoso de β A sin presencia de depósito vascular. **D: Grupo D:** casos control sin depósito de β A vascular ni parenquimatoso. Inmunohistoquímica con anticuerpo anti- β -Amiloide 100x.

A.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Para evaluar la distribución de los depósitos de β A, se seleccionaron hasta 3 bloques de áreas corticales, incluida la corteza perhipocampal en cinco casos, para poder evaluar un número equivalente de vasos meníngeos y corticales (20-30 por caso). Las regiones del troncoencéfalo y cerebelo no se analizaron en este estudio. En aquellas muestras de pacientes que sufrieron una HIC, se evaluaron áreas alejadas de la lesión hemorrágica.

Se realizaron cortes consecutivos de los bloques seleccionados, y sobre éstos se realizaron las técnicas inmunohistoquímicas. Se desparafinaron los cortes y se bloquearon las peroxidasas endógenas con metanol-H₂O₂ y los sitios de unión no específicos con suero de cabra normal al 10% durante 1 hora. Las secciones fueron teñidas con anticuerpo anti-ApoE de ratón (Clon E6D7, 1:200, Calbiochem-NE1004, Madrid, España), anticuerpo anti-ApoJ de ratón (Clon 5 BD Pharmingen-552886, 1:1000, Madrid, España) y anticuerpo anti-ApoA-I (Clon EP1368Y, Abcam-ab52945, 1:200, Cambridge, Reino Unido) durante 40 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con anticuerpo secundario de ratón (peroxidasa de rábano picante, 1: 500) durante 8 minutos. Los sitios inmunorreactivos se revelaron con solución de DAB y las secciones en serie se tiñeron con hematoxilina.

Se evaluaron semicuantitativamente los vasos meníngeos y corticales, las neuronas, los astrocitos subpiales y los depósitos parenquimatosos en las áreas corticales y perihipocampales. Dos neuropatólogos evaluaron los tres anticuerpos en un microscopio multicabezal hasta llegar a un acuerdo, ciegos a la distribución del grupo.

A.3. Evaluación de ApoE, ApoJ y ApoA-I

La presencia de depósitos vasculares de ApoE, ApoJ y ApoA-I **en arterias corticales y meníngeas** se clasificó según el porcentaje de arterias positivas para las diferentes técnicas respecto al total de arterias representadas en la laminilla: se otorgó una puntuación de **0** cuando no se encontraron arterias positivas, **1** cuando menos del 30% de las arterias eran positivas, **2** cuando se encontraban del 30 al 75% de las arterias positivas y **3** cuando más del 75% de las arterias evaluadas eran positivas.

La presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en **capilares corticales** se evaluó en 10 campos de gran aumento (CGA) y se valoró de la siguiente manera: se otorgó una puntuación de **0** cuando los capilares eran negativos, **1** cuando la tinción era fina, granular y focal (en <50% de los capilares), **2** cuando la tinción era fina, lineal y focal,

3 cuando la señal era fina y difusa (en >50% de los capilares) y **4** cuando se observaba un depósito grueso en la pared de los capilares (Fig. 10).

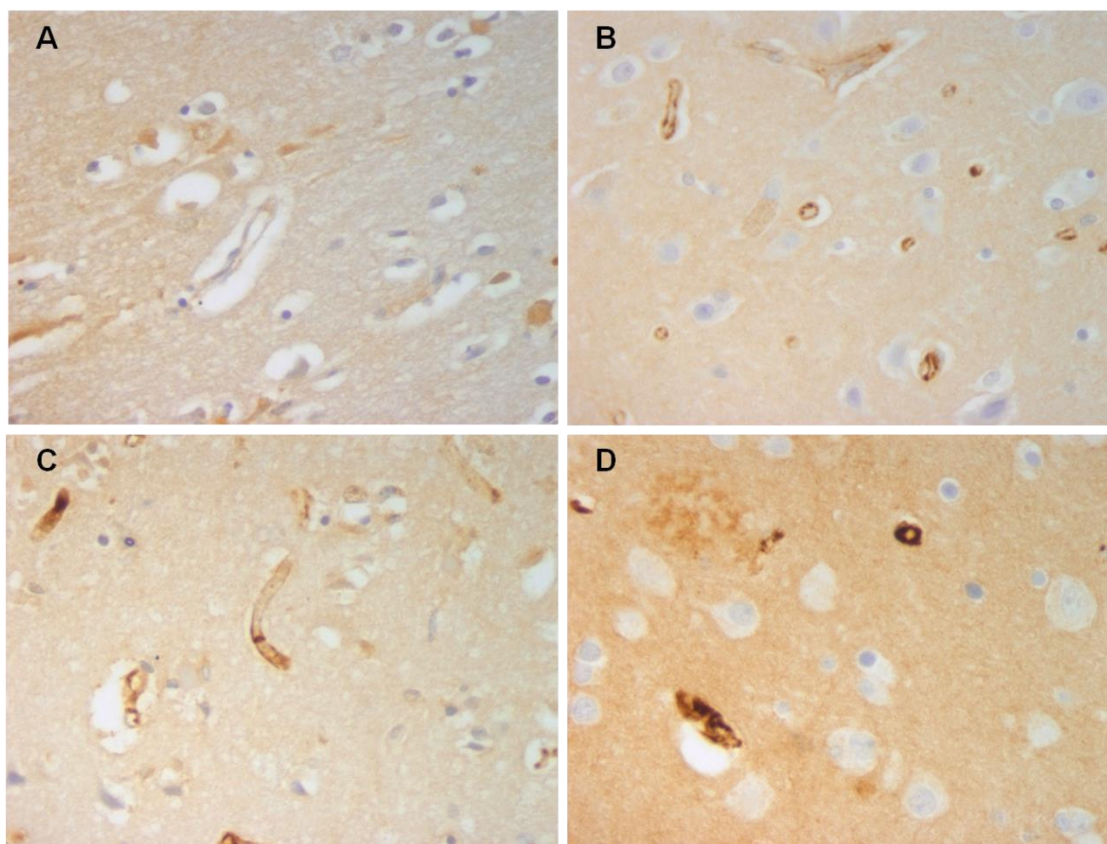


Fig. 10: Imágenes representativas de la puntuación de la expresión capilar de las apolipoproteínas, **A:** Capilar sin evidencia de tinción de ApoA-I (**puntuación 0**). **B:** Tinción fina y granular en el endotelio del capilar con ApoA-I (**puntuación 1** cuando la tinción es focal (en <50% de los capilares) y **puntuación 3** cuando la tinción es difusa (en >50% de los capilares)). **C:** Tinción fina y lineal en el endotelio del capilar con ApoA-I (**puntuación 2** cuando la tinción es focal y **puntuación 3** cuando la tinción es difusa). **D:** Tinción de pared gruesa en la pared de los capilares con ApoA-I (**puntuación 4**). 400x.

Los **depósitos parenquimatosos** de ApoE, ApoJ y ApoA-I se evaluaron en 10 CGA y se clasificaron según el número de depósitos parenquimatosos, divididos en placas de aspecto “neurítico” y placas de tipo “difuso”: se otorgó una puntuación de **0** cuando no se identificaron depósitos parenquimatosos, **1** cuando éstos eran aislados (<5/CGA), **2** cuando la densidad de los depósitos era de 5 a 10/CGA, y **3** cuando los depósitos eran frecuentes (>10/CGA).

La expresión de ApoE, ApoJ y ApoA-I en el citoplasma de los astrocitos subpiales y las neuronas piramidales se evaluaron semicuantitativamente de 0 a 3: **0**-ausencia de

expresión, 1-expresión de intensidad leve, 2-expresión de intensidad moderada y 3-expresión de intensidad alta.

A.4. Genotipo ApoE

Se realizó extracción de ADN genómico del tejido fijado en formol e incluido en parafina usando el kit EZ1 DNA Tissue (48) y Bio Robot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania). Los genotipos *APOE* (rs429358 y rs7412) se determinaron por discriminación alélica utilizando los reactivos de genotipado SNP C-3084793 y C-904973 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y TaqMan_Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) en un analizador Rotor Gene 6000 Real-Time PCR (Corbett Life Sciences, Valencia, CA, EE. UU.).

A.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 17.0. Las asociaciones clínicas o patológicas con la edad (con una distribución normal después de aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov) se examinaron utilizando la prueba t de Student o la prueba ANOVA unidireccional. El resto de las variables analizadas se consideraron como variables categóricas y las diferencias de frecuencia se calcularon utilizando la prueba de Chi cuadrado (X^2) o la prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia 2 x 2. El análisis de regresión logística se realizó para identificar asociaciones independientes con la expresión de las apolipoproteínas. Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

B) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE CD2AP EN LA EA

B.1. Selección de pacientes

Se seleccionaron muestras de tejido cerebral procedentes de 81 autopsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del HUVH (Barcelona) (Cohorte A) y el

Centro de Investigación de Enfermedades Neurológicas de la Fundación CIEN (Madrid) (Cohorte B). En esta serie se incluyeron 45 pacientes con cambios neuropatológicos de EA y 21 pacientes con una taupatía distinta de la EA (7 casos de EPI, 9 casos de PSP y 5 casos de DCB). Se analizaron como casos control 15 pacientes sin evidencia de depósito de pTau. Las características de los pacientes se presentan en la Tabla 2. Los pacientes incluidos en el estudio o sus familiares manifestaron su disposición a donar el tejido cerebral con fines de investigación y fueron donantes del Banco de Tejidos Neurológicos del HUVH o del Banco de Cerebros de la Fundación CIEN. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUVH, Barcelona, España (PR(IR)173/2019).

Patología	Cohorte	N	Edad	Sexo(F)
EA	A	17	77.8±8.3	10 (58.8%)
	B	28	79.6±12.2	18 (64.3%)
	Total	45	78.9±10.8***	28 (62.2%)
Controles	A	6	59.2±12.4	2 (33.3%)
	B	9	62.9±8.6	5 (55.6%)
	Total	15	61.4±10.0	7 (46.7%)
PSP	B	9	74.2±9.1*	4 (44.4%)
DCB	B	5	72.4±8.6	2 (40.0%)
EPI	B	7	75.1±9.7*	3 (42.9%)
p			<0.001	0.580

Tabla 2: Características demográficas de la cohorte A (HUVH) y cohorte B (Fundación CIEN) y de las dos cohortes en conjunto (total) según los diferentes grupos de enfermedades. Los números en negrita indican diferencias estadísticamente significativas. *** p<0.001 vs grupo control, * p<0.05 vs grupo control. EA: enfermedad de Alzheimer. PSP: Parálisis supranuclear progresiva. DCB: Degeneración córticobasal. EPI: Enfermedad de Pick.

B.2. Evaluación de pTau y β A en EA y casos control

Todas las muestras de tejido cerebral se obtuvieron de 2 a 20 horas después de la muerte y se fijaron en formol tamponado al 10% durante 3-4 semanas. Tras realizar un examen macroscópico del cerebro, se seleccionaron 27 áreas corticales y subcorticales, incluidos el troncoencéfalo y el cerebelo para el diagnóstico histológico de rutina. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 3 μ m y se tiñeron con H-E. De cada caso, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas en bloques de tejido representativos de los lóbulos frontal, temporal, parietal y occipital; y en el hipocampo, amígdala, tronco cerebral y cerebelo utilizando un anticuerpo anti- β -Amiloide de ratón (Clon 6F/3D 1:500, Dako, Glostrup, Dinamarca) y un anticuerpo anti-Tau de ratón (Clon AT8 1:20, Thermo Scientific, Rockford, EE. UU.).

Los pacientes con EA se clasificaron según el estadio de Braak⁶⁹. La patología global de la EA, incluyendo el depósito de β A, se evaluó y clasificó de acuerdo con los criterios neuropatológicos de la NIA-AA⁶⁷. Como consecuencia, los casos con estadios de Braak I o II se reclasificaron como B1, Braak III y IV como B2 y Braak V o VI como B3. Los depósitos de β A se evaluaron inicialmente de 0 a 5 (según las fases de Thal⁶⁸) y se reclasificaron como A0 (Thal 0), A1 (Thal 1 o 2), A2 (Thal 3) o A3 (Thal 4 o 5). Los criterios de CERAD⁷⁰ A a C se transformaron en C1 (CERAD A), C2 (CERAD B) o C3 (CERAD C). La combinación de estos tres sistemas de clasificación dio una puntuación "ABC" que indicaba una probabilidad nula, baja, intermedia o alta de EA.

B.3. Evaluación de pTau y Tau-3R en otras taupatías

En el estudio se incluyeron 21 casos de taupatías que se diagnosticaron cuando se encontraron cambios neuropatológicos característicos⁶⁴. En estos casos, la inmunohistoquímica de pTau se realizó como se describe en el apartado anterior (B. 2.). Para la evaluación de Tau-3R en los casos de EPi, se tiñeron secciones de 3 μ m procedentes de la corteza frontal y parietal con el anticuerpo anti-Tau-3R de ratón (Clon 8E6/C11, 1: 100 Merck Millipore, Temecula, EE. UU.). Para ello se utilizó el

Módulo de tinción Benchmark XT con el kit de detección universal DAB ultraView (Ventana Medical Systems). La desparafinización se llevó a cabo utilizando la solución EZ Prep™. El anticuerpo primario se incubó durante 1 hora a una dilución 1/100 y se localizó mediante un anticuerpo secundario conjugado a un cóctel de anticuerpos marcados con HRP (HRP multimer). A continuación, se visualizó el complejo resultante utilizando cromógeno DAB y finalmente se contratiñó con hematoxilina y reactivo Bluing. La inmunoreactividad de Tau-3R en los casos de EPI (n=7) se evaluó como el número total de inclusiones neuronales positivas y la presencia o ausencia de neuritas positivas en 10 CGA.

B.4. Inmunohistoquímica para CD2AP

Se seleccionaron cuatro regiones cerebrales para evaluar la tinción inmunohistoquímica para CD2AP en casos de EA y controles: el hipocampo anterior, el hipocampo posterior, el lóbulo temporal y el lóbulo occipital. En los casos de EPI, PSP y DCB, se seleccionaron dos regiones: los lóbulos frontal y parietal. Se realizaron cortes de los bloques de parafina de dichas áreas en secciones de 3 µm y se tiñeron con el anticuerpo anti-CD2AP de ratón (Clon HPA003326, 1:200, Sigma-Aldrich, ST. Louis, EE. UU.), utilizando el módulo de tinción Benchmark XT con el kit de detección ultraView Universal DAB (Ventana Medical Systems). El desparafinado se llevó a cabo mediante la solución EZ prep™. El anticuerpo primario se incubó 40 minutos a una dilución 1/200 y se localizó mediante un anticuerpo secundario HRP Multimer. A continuación, se visualizó el complejo resultante utilizando el cromógeno DAB y finalmente se realizó contratinción con hematoxilina y reactivo Bluing.

Se evaluó la expresión de CD2AP en paredes vasculares (arterias meníngeas y corticales, y capilares), neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, endotelio y depósitos parenquimatosos en todas las muestras.

Para estudiar la posible asociación del depósito de CD2AP neuronal con pTau, se utilizó la puntuación "B" de los criterios de la NIA-AA^{67, 69} para clasificar los depósitos de CD2AP en los casos de EA y control: se asignó una calificación de CD2AP-0 a los casos sin depósito neuronal de CD2AP, CD2AP-1 se asignó a los casos con depósitos en la región transentorrinal y/o entorrinal, CD2AP-2 cuando los depósitos se extendían a la circunvolución óccipito-temporal y/o temporal medial, y CD2AP-3 a los casos con depósitos que se habían extendido a la zona peristriada, paraestriada y/o estriada (Fig. 11).

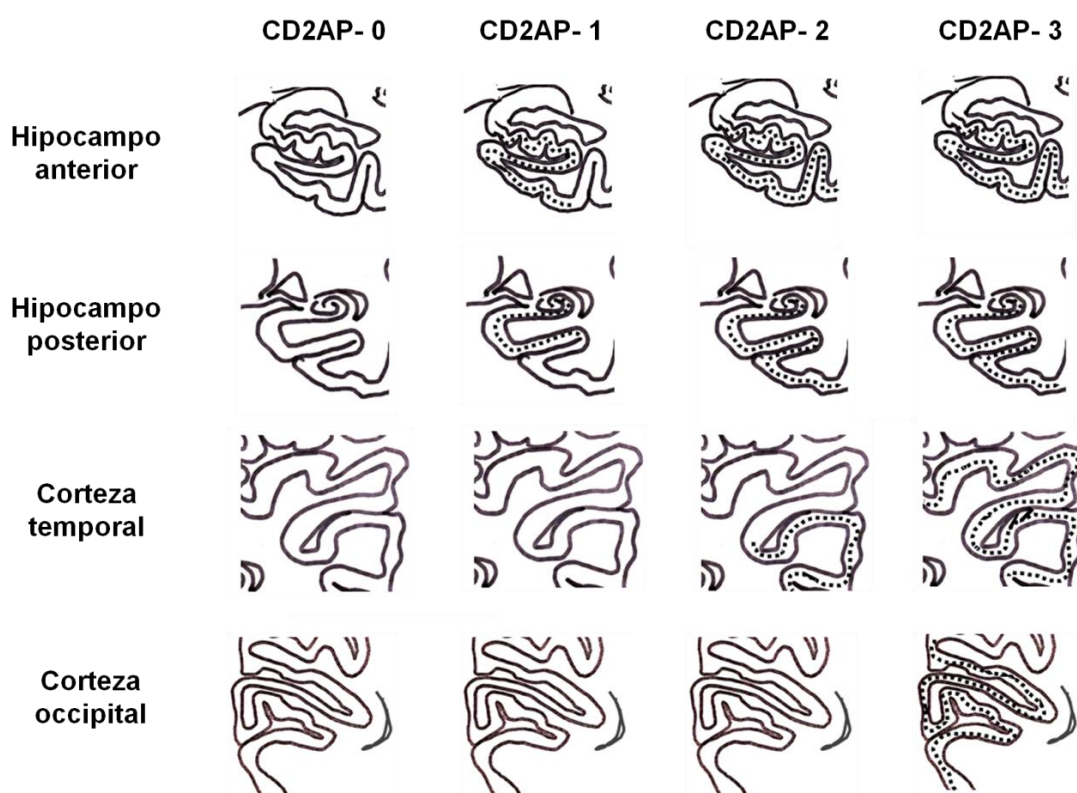


Fig. 11. Representación esquemática de la puntuación de CD2AP establecida según la positividad en neuronas de diferentes regiones estudiadas para la evaluación de los estadios de Braak.

En las taupatías primarias, no asociadas a EA, primero se realizó una evaluación cualitativa, y específicamente en los casos de EPI (N=7) se hizo una segunda evaluación cuantitativa de CD2AP tal y como se detalla al final del apartado B.3 (similar a la realizada para Tau-3R).

B.5. Inmunofluorescencia para CD2AP

La expresión de CD2AP y pTau se evaluó mediante inmunofluorescencia en secciones sin teñir de 3 μm de grosor procedentes de cerebros con EA. Se desparafinaron, hidrataron y se incubaron con tampón citrato durante 30 minutos a 95°C para mejorar la exposición al antígeno. Tras el bloqueo, se incubaron las secciones durante toda la noche con anticuerpo anti-Tau AT8 (5 $\mu\text{g/ml}$, Thermo Fisher) y anticuerpo anti-CD2AP (1 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich). A continuación, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios IgG anti-ratón Alexa Fluor-568 y anticuerpos secundarios IgG anti-conejo Alexa Fluor-488 (Life Technologies) diluidos a 1:500 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Para reducir la autofluorescencia del tejido cerebral, las secciones del cerebro se incubaron luego con Sudan Black B al 0,3% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron en cubreobjetos utilizando Vectashield con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories). Las imágenes de doble inmunofluorescencia se capturaron con un microscopio confocal Zeiss LSM980.

B.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS Statistics versión 21 (IBM Corporation). Las asociaciones de variables categóricas se analizaron mediante tablas de contingencia y una prueba X^2 con el valor p de Pearson. La distribución de la edad se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando los datos se distribuyeron normalmente, las variables se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) y se aplicó una prueba de ANOVA con corrección de Bonferroni para análisis multivariante. Cuando los datos no seguían una distribución normal, las variables se expresaron como mediana [rango intercuartílico] y se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. También se determinaron asociaciones univariantes entre la puntuación de CD2AP (CD2AP-0 a CD2AP-3) y variables categóricas mediante tablas de contingencia y una prueba de X^2 . En este caso, se utilizó el valor p de Pearson para

el sexo, mientras que el valor p de la asociación lineal se utilizó para las fases de Thal, el estadio de Braak, los criterios de CERAD y el riesgo de EA. La asociación de la puntuación de CD2AP con la variable continua de la edad se valoró aplicando una prueba de Kruskal-Wallis. El análisis de regresión de los datos categóricos (CATREG) se realizó utilizando sólo las variables significativas tras el análisis univariante. Se obtuvieron los coeficientes estandarizados beta con la estimación correspondiente del error estándar (EE) y el valor p. Un valor p inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

A) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE APOE, APOJ Y APOA-I EN LA AAC

Los niveles y la localización de ApoE, ApoJ y ApoA-I fueron evaluados en cuatro grupos diferentes de pacientes según la presencia o ausencia del depósito vascular o parenquimatoso de β A (Fig.9). Las características demográficas, clasificación y gradación de la AAC y la EA, y el genotipo de *APOE* de todos los pacientes están incluidos en la tabla 1.

Los casos de AAC (grupos A [AAC tipo I] y B [AAC tipo II]) fueron significativamente mayores que los casos que no presentaban AAC (grupos C [depósitos parenquimatosos de β A sin depósito vascular] y D [controles]) (81 ± 7 frente a 66 ± 12 , $p = 0.026$). La HIC fue la causa de muerte más frecuente en los pacientes con AAC en comparación con los casos sin AAC [50% (7/14) vs. 0% (0/6), $p = 0.036$]. Entre los pacientes con AAC tipo I y los de tipo II no se encontraron diferencias en la edad ($p = 0.983$), el sexo ($p = 0.774$) o la causa de muerte ($p = 0.298$). Sin embargo, el genotipo *APOE* ϵ 4 estuvo más representado en pacientes con AAC tipo I que en aquellos que carecían de afectación capilar (AAC tipo II) [67% (4/6) frente a 13% (1/8), $p = 0.036$]. Los casos de AAC tipo II tuvieron una frecuencia de alelos ϵ 2 ligeramente más alta que la de AAC tipo I, aunque las diferencias no fueron significativas [38% (3/8) frente a 17% (1/6), $p = 0.393$]. El genotipo *APOE* no se asoció estadísticamente con el sexo, la edad u otras características patológicas.

La presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en arterias meníngeas y corticales, capilares y en forma de depósitos parenquimatosos similares a las placas neuríticas y difusas fue analizada mediante inmunohistoquímica. Se muestran ejemplos de las técnicas inmunohistoquímicas para cada apolipoproteína y su localización en la figura 12.

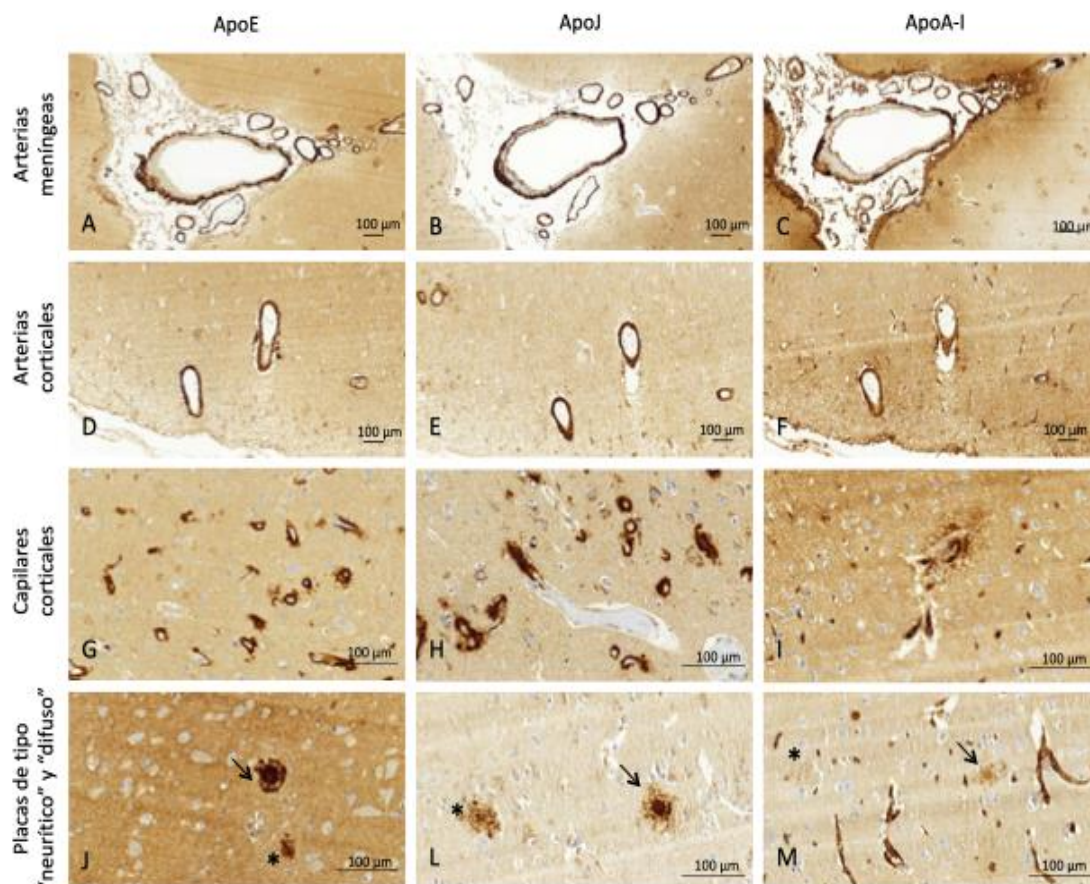


Fig. 12: Ejemplos de positividad para ApoE, ApoJ y ApoA-I en arterias corticales y meníngicas, capilares, y en depósitos parenquimatosos de tipo “neurítico” (flecha) y “difuso” (*).

A.1. Presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en arterias cerebrales

En los **vasos meníngicos**, la positividad de ApoE no fue significativamente diferente entre los grupos ($p= 0.307$): se asignó una puntuación de 3 al 67% de los casos de AAC tipo I (4/6), al 50% de los AAC tipo II (4/8) y al 33% de los casos control (1/3). Los niveles de positividad de ApoJ en los vasos meníngicos fueron más altos que los de ApoE, pero estuvieron representados de manera similar en todos los grupos ($p= 0.448$). La puntuación más alta de presencia de ApoJ (puntuación 3) se otorgó al 83% de los casos de AAC tipo I (5/6), al 87% de los casos de AAC tipo II (7/8), al 67% de los cerebros con depósito parenquimatoso de βA sin afectación vascular (2/3) y al 67% de los casos control (2/3). ApoA-I mostró una menor presencia en los vasos meníngicos que ApoE o ApoJ, sin diferencias significativas entre grupos ($p= 0.905$), recibiendo una puntuación de 1 o 0 en la mayoría de los casos. La presencia de ApoE,

ApoJ y ApoA-I en las arterias meníngeas no fue significativamente diferente entre los casos de AAC tipo I y AAC tipo II o entre los casos de AAC y no AAC (Fig. 13A). El genotipo *APOE* no se asoció con la expresión de ApoE, ApoJ y ApoA-I en las arterias meníngeas.

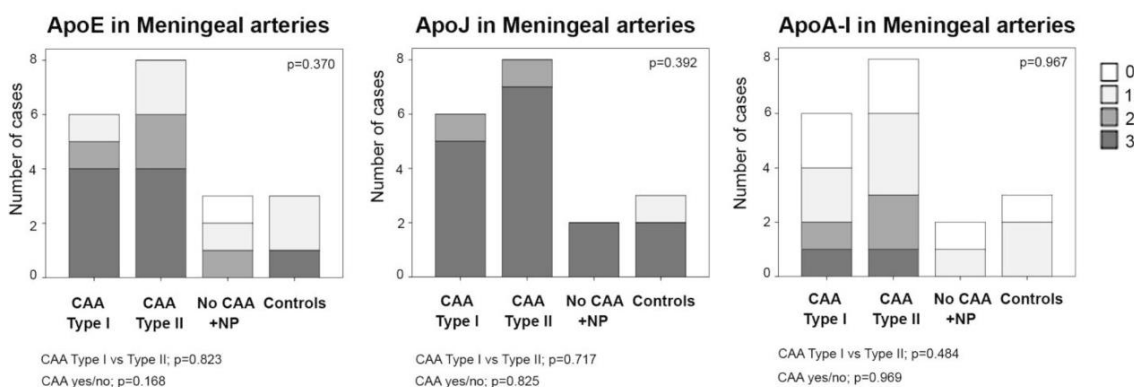


Fig. 13A: Distribución de ApoE, ApoJ y ApoA-I en arterias meníngeas. **0:** sin tinción; **1:** tinción en <30% de los vasos; **2:** tinción en 30-75% de los vasos; **3:** tinción en >75% de los vasos. Las diferencias estadísticas se calcularon usando la prueba de chi-cuadrado (χ^2).

Con respecto a la presencia de estas apolipoproteínas **en las arterias corticales**, se encontró una puntuación de 3 para ApoE en el 50% de los casos de AAC tipo I (3/6) y en el 63% de los casos de AAC tipo II (5/8). Curiosamente, ninguno de los vasos corticales de los cerebros con depósitos parenquimatosos de β A sin afectación vascular mostró positividad para ApoE (todos los casos obtuvieron una puntuación de 0); sin embargo, las diferencias entre los 4 grupos no alcanzaron significación estadística ($p=0.114$). La positividad cortical vascular de ApoJ fue mayor que la de ApoE, mostrando una puntuación de 3 en todos los casos de AAC tipo I (100%, 6/6), en el 63% de los AAC tipo II (2/3) y en el 33% de los cerebros con depósitos parenquimatosos de β A sin afectación vascular (1/3). La presencia de ApoJ en los vasos corticales de los controles fue menor que en aquellos casos con depósito cerebral de β A, llegando a encontrar diferencias significativas evaluando los cuatro grupos analizados ($p=0.048$). La presencia de ApoA-I fue menos frecuente en los vasos corticales y se distribuyó de manera similar entre los grupos ($p=0.441$). La

expresión de ApoE, ApoJ y ApoA-I en arterias corticales no fue significativamente diferente entre los casos de AAC tipo I y AAC tipo II. Sin embargo, los cerebros con AAC presentaron un mayor porcentaje de positividad para ApoE en vasos corticales que los casos no AAC sin llegar a obtener diferencias estadísticas ($p=0.099$), que sí se observaron en el caso de ApoJ ($p=0.018$) (Fig. 13B). Además, se encontró una tendencia estadística entre la presencia de ApoE en arterias corticales y ser portador del genotipo $APOE\epsilon 2$ ($p=0.058$).

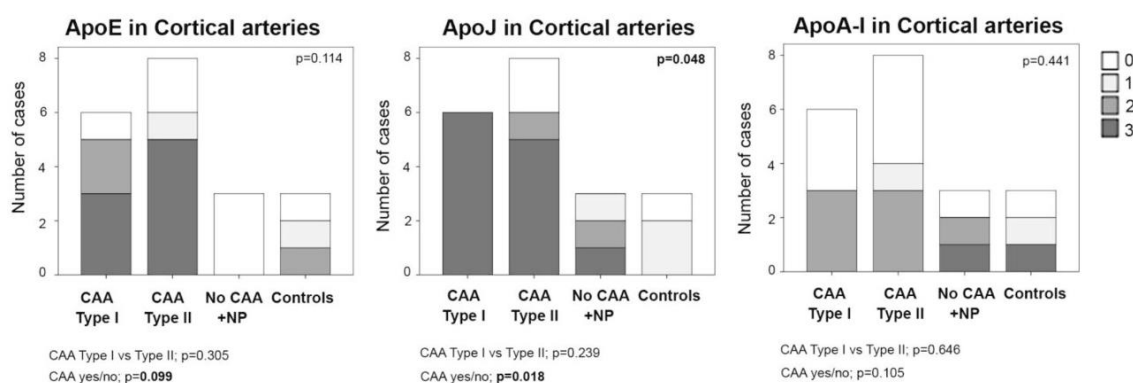


Fig. 13B: Distribución de ApoE, ApoJ y ApoA-I en arterias corticales. 0: sin tinción; 1: tinción en <30% de los vasos; 2: tinción en 30-75% de los vasos; 3: tinción en >75% de los vasos. Las diferencias estadísticas se calcularon usando la prueba de chi-cuadrado (X^2).

A.2. Presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en capilares corticales

El 83% de los casos de AAC tipo I (5/6) mostró una puntuación de 4 en la valoración de ApoE en capilares, siendo esta positividad significativamente superior a la encontrada en los otros grupos del estudio ($p=0.002$). De hecho, la positividad de ApoE en capilares cerebrales fue significativamente más abundante en los casos de AAC tipo I que en los casos de AAC tipo II ($p=0.004$). La positividad de ApoJ en capilares siguió el mismo patrón que ApoE. El 100% de los casos de AAC tipo I (6/6) presentaron la puntuación más alta en los niveles de ApoJ (4), mientras que la puntuación media fue más baja en los otros grupos ($p=0.001$). La expresión de ApoJ en los capilares cerebrales de los casos de AAC tipo I fue mayor que la de los del tipo

II ($p= 0.002$). Curiosamente, la positividad de ApoA-I en los capilares fue más pronunciada y más homogénea en todos los grupos del estudio, aunque los capilares de las muestras de AAC tipo I también presentaron una presencia de ApoA-I más elevada, obteniendo la puntuación más alta en el 83% de los casos (5/6), siendo la diferencia frente a los otros grupos estadísticamente significativa ($p= 0.006$). De hecho, los niveles de ApoA-I en los capilares cerebrales fueron significativamente más elevados en los casos de AAC tipo I que en los de AAC tipo II ($p= 0.003$) (Fig. 14). Además, se analizaron las posibles asociaciones entre la presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en los capilares cerebrales y el genotipo *APOE*. En este sentido, sólo la expresión de la proteína ApoE en los capilares se relacionó con el genotipo *APOEε4* ($p= 0.035$), aunque la asociación no alcanzó significación estadística después del ajuste por edad y subtipo de AAC (odds ratio (OR) 2.32; 95% de intervalo de confianza (IC) [0.97–5.87], $p= 0.073$).

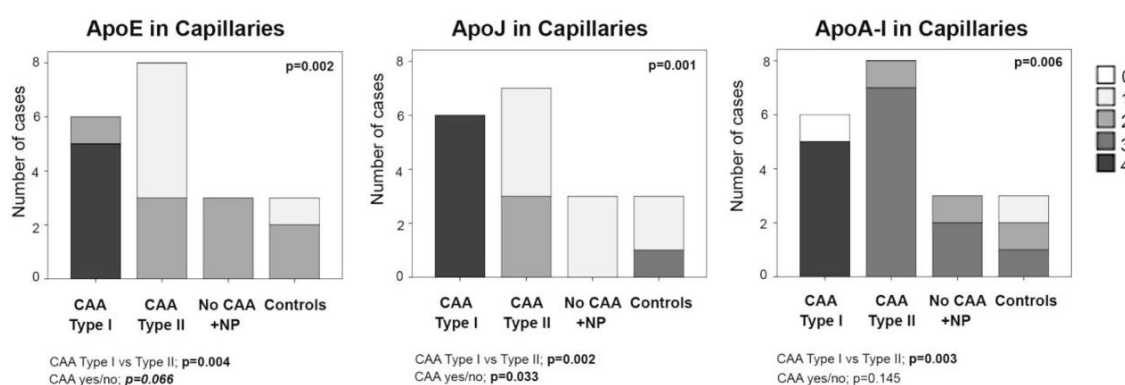


Fig. 14: Distribución de ApoE, ApoJ y ApoA-I en capilares corticales. **0:** sin tinción; **1:** tinción de la pared granular y focal (<50% de los capilares); **2:** tinción de la pared lineal y focal (<50% de los capilares); **3:** tinción de la pared difusa (>50% de los capilares); **4:** Tinción intensa y gruesa de la pared. Las diferencias estadísticas se calcularon usando la prueba de chi-cuadrado (χ^2).

A.3. Depósitos intraparenquimatosos de ApoE, ApoJ y ApoA-I

Se encontraron frecuentes placas con refuerzo central (“**tipo neurítico**”, ver Fig. 12) positivas para ApoE (con una puntuación de 3) en el 50% de los casos de AAC tipo I (3/6), en el 63% de los casos de AAC tipo II (5/8) y en el 67% de los casos con depósitos parenquimatosos de β A sin afectación vascular (2/3), sin hallar placas de

“tipo neurítico” positivas para ApoE en los casos control (diferencias significativamente estadísticas entre los 4 grupos: $p= 0.002$). Del mismo modo, el 33% de los casos de AAC tipo I (2/6) y el 63% de los casos de AAC tipo II (5/8) mostraron frecuentes placas de ApoJ de “tipo neurítico” (puntuación de 3), mientras que hubo puntuaciones más bajas en los casos con depósitos parenquimatosos de β A sin afectación vascular, sin placas positivas para ApoJ en los casos control ($p= 0.002$). Prácticamente no se encontraron depósitos intraparenquimatosos de ApoA-I en las muestras analizadas, y la distribución no fue diferente entre los grupos ($p= 0.490$). No se encontraron diferencias en el número de placas de “tipo neurítico” de ApoE, ApoJ o ApoA-I entre los casos de AAC tipo I y tipo II (Fig. 15A).

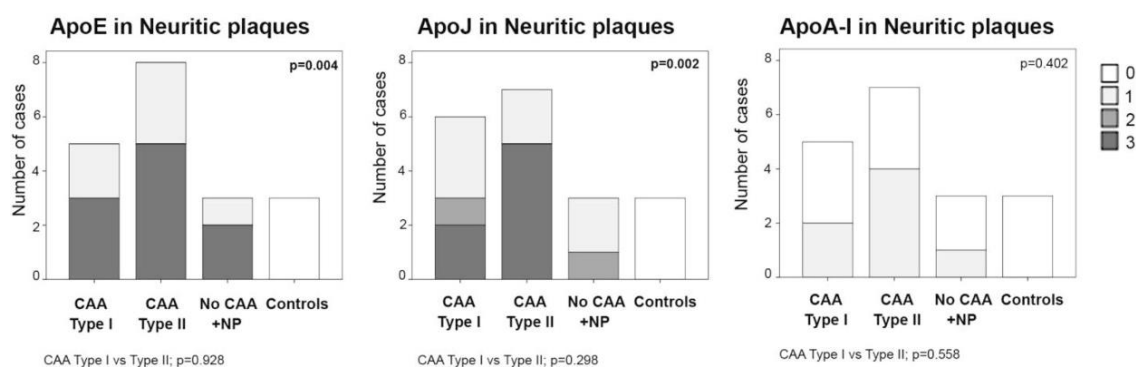


Fig. 15A: Distribución de ApoE, ApoJ y ApoA-I en las placas de “tipo neurítico”. 0: ausentes; 1:1-4 placas/CGA; 2:5-10 placas/CGA; 3: >10 placas/CGA. Las diferencias estadísticas se calcularon usando la prueba de chi-cuadrado (χ^2).

Por otro lado, se encontraron **depósitos intraparenquimatosos de “tipo difuso”** (Fig. 12) positivos para ApoE con una puntuación de 3 (frecuentes) en el 50% de los casos de AAC tipo I (3/6), en el 63% de los de AAC tipo II (5/8) y en el 67% de los casos con depósitos de β A en parénquima sin afectación vascular (2/3). Los controles presentaron menos placas de “tipo difuso” de ApoE, sin embargo, las diferencias entre los 4 grupos no fueron estadísticamente significativas ($p=0.389$). La presencia de ApoJ en forma de placas de “tipo difuso” fue frecuente (puntuación 3) en el 33% de los casos de AAC tipo I (2/6) y en el 63% de los casos de AAC tipo II (5/8), en comparación con una detección más baja en el resto de los grupos ($p= 0.017$). Aunque

se encontraron placas de “tipo difuso” de ApoE y ApoJ en el 67% de los controles (2/3), los grupos C y D presentaron puntuaciones más bajas en comparación con los grupos A y B. Las placas de “tipo difuso” de ApoA-I fueron globalmente menos frecuentes que las positivas para ApoE y ApoJ, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos ($p= 0.234$). La presencia de ApoE, ApoJ o ApoA-I en placas de “tipo difuso” tampoco fue diferente entre los casos de AAC tipo I y tipo II (Fig. 15B). El genotipo *APOE* no se asoció con la presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I formando depósitos parenquimatosos de “tipo neurítico” o de “tipo difuso” en esta cohorte.

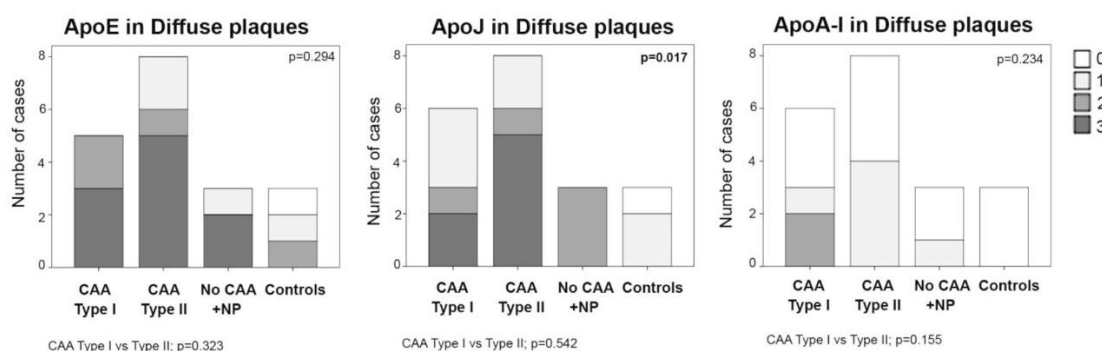


Fig. 15B: Distribución de ApoE, ApoJ y ApoA-I en las placas de “tipo “difuso”. 0: ausentes; 1:1-4 placas/CGA; 2:5-10 placas/CGA; 3: >10 placas/CGA. Las diferencias estadísticas se calcularon usando la prueba de chi-cuadrado (X^2).

Se evaluó asimismo la presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I en células cerebrales, encontrando que las tres apolipoproteínas se expresaban en el citoplasma de las neuronas piramidales y de los astrocitos subpiales de diferentes áreas corticales y perhipocampales analizadas (Fig. 16). No se detectaron diferencias en el número de células positivas ni en la intensidad de la expresión para ApoE, ApoJ o ApoA-I entre los 4 grupos analizados o entre los casos de AAC tipo I y AAC tipo II.

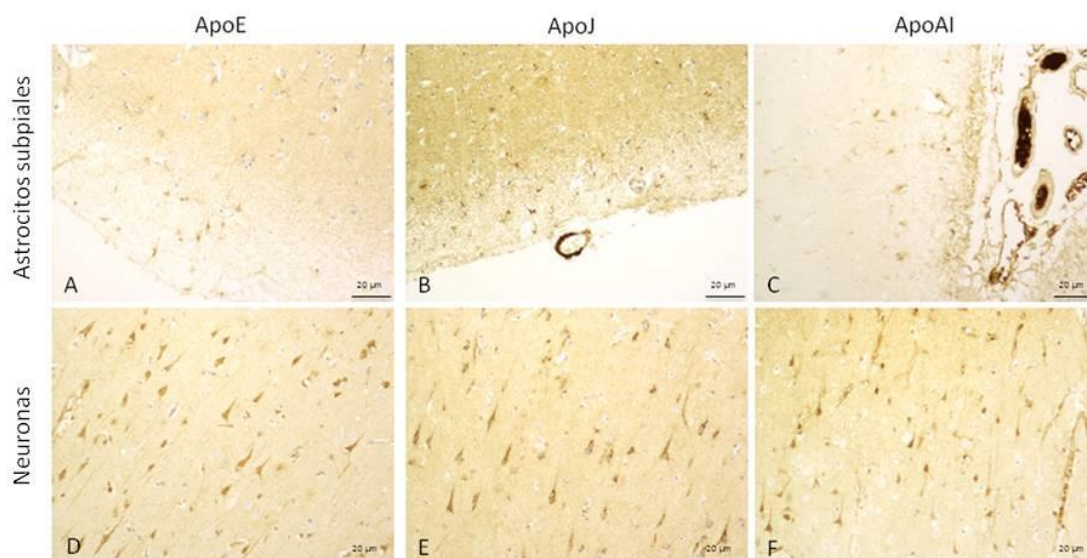


Fig. 16: Imágenes representativas de las tinciones de ApoE, ApoJ y ApoA-I en astrocitos subpiales y neuronas piramidales. Se detectó una expresión granular citoplasmática en astrocitos subpiales y neuronas piramidales tanto para ApoE (A y D), ApoJ (B y E) y ApoA-I (C y F). 400x.

A.4. Análisis de la asociación de la presencia de ApoE, ApoJ y ApoA-I vascular y la HIC

En la cohorte de cerebros post mortem analizados, la HIC lobar fue la principal causa de muerte en los pacientes con AAC (N= 7, Tabla 1). No se encontró asociación entre la HIC y el sexo de los pacientes, a diferencia de la edad: los sujetos que sufrieron una HIC fueron mayores que el resto (83 ± 6 vs. 73 ± 11 , $p= 0.040$). Se evaluó la posible asociación entre los niveles de ApoE, ApoJ y ApoA-I en vasos cerebrales y la aparición de una HIC, excluyendo la presencia de apolipoproteínas en la localización del hematoma agudo. En este sentido, la presencia de ApoE fue significativamente mayor en los capilares, en las arterias meníngeas y en las corticales en aquellos pacientes que sufrieron una HIC ($p=0.035$, $p=0.048$ y $p=0.015$, respectivamente), aunque la presencia de ApoE no estaba asociada con la edad. En contraste, los niveles de ApoE en las placas no fueron diferentes en pacientes que habían sufrido una HIC. La presencia de ApoA-I en las arterias meníngeas fue más elevada en pacientes con HIC que en el resto de sujetos ($p= 0.006$), mientras que la presencia de

ApoJ no se asoció estadísticamente con ocurrencia de HIC. Aún así, después de ajustar por la edad y el genotipo *APOE*, la presencia de ApoE en las arterias corticales fue el único predictor independiente de sufrir una HIC (OR, 9.40, IC 95% [1.05-84.41], $p= 0.046$) (Fig. 17). En cuanto al genotipo, *APOE* ϵ 2 se asoció con haber sufrido una HIC ($p= 0.017$). Curiosamente los pacientes con AAC e HIC tenían una mayor frecuencia de presentar el genotipo *APOE* ϵ 2 en comparación con los pacientes con AAC sin HIC [57% (4/7) vs. 0% (0/7), $p= 0.018$].

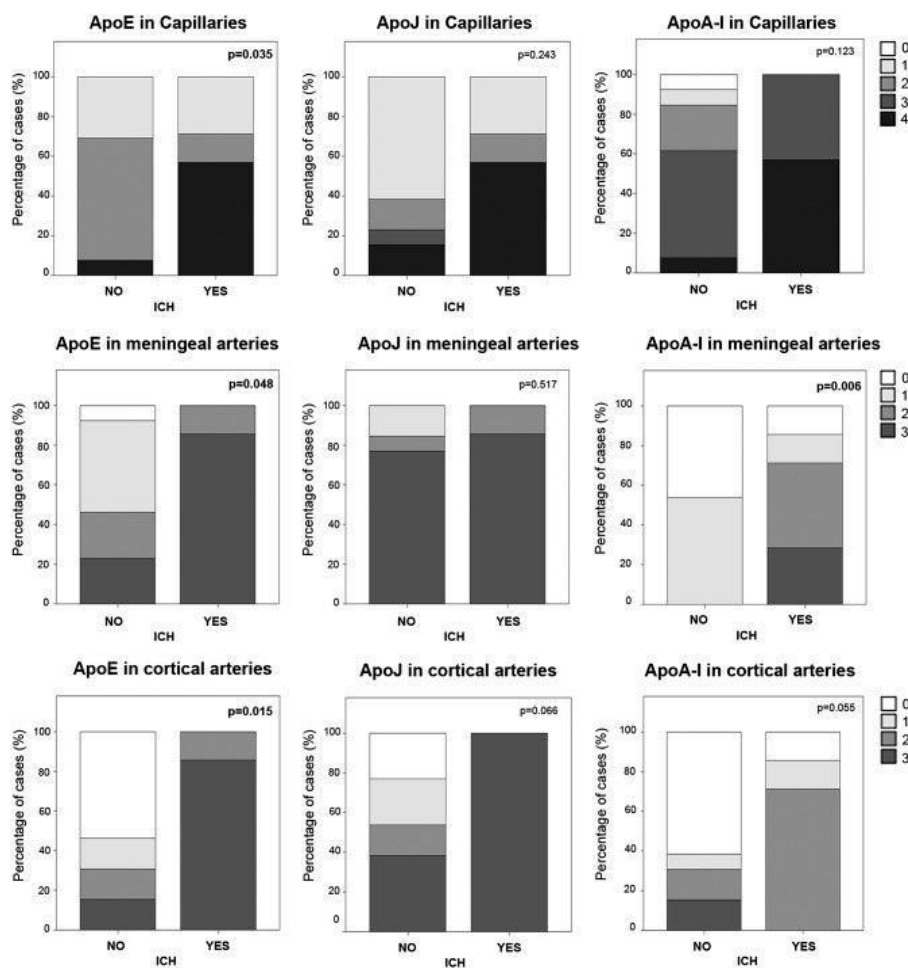


Fig. 17: Distribución de ApoE, ApoJ y ApoA-I en capilares corticales, arterias meníngeas y arterias corticales en casos con y sin HIC. Las gráficas representan el porcentaje de casos con las diferentes puntuaciones de inmunopositividad en cada grupo (con y sin HIC). La tinción de los capilares cerebrales se clasificó como **0**: sin tinción; **1**: tinción de la pared granular y focal (<50% de los capilares); **2**: tinción de la pared lineal y focal (<50% de los capilares); **3**: tinción de la pared difusa (>50% de los capilares); **4**: Tinción intensa y gruesa de la pared. La tinción de las arterias se clasificó como **0**: sin tinción; **1**: tinción en <30% de los vasos; **2**: tinción en 30-75% de los vasos; **3**: tinción en >75% de los vasos. Las diferencias estadísticas se calcularon usando la prueba de chi-cuadrado (X^2).

B) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE CD2AP EN LA EA

B.1. Inmunopositividad de CD2AP en EA

Inicialmente, la distribución de la expresión de CD2AP y su posible asociación con la patología pTau y β A se analizaron inmunohistoquímicamente en áreas corticales de muestra cerebrales post mortem procedentes de la Cohorte A. En los casos de EA se identificaron depósitos neuronales de CD2AP que se asemejaban a ovillos neurofibrilares y, en menor medida, fibras tortuosas similares a hebras de neuropilo en las regiones en las que se observaba patología pTau (Fig. 18A y B). Sin embargo, no se encontraron neuritas distróficas positivas para CD2AP (Fig. 18C-D). Tampoco se identificaron depósitos de CD2AP en paredes vasculares ni en el parénquima cerebral de regiones cerebrales con depósito parenquimatoso y vascular de β A (como se muestra en niveles corticales consecutivos en la figura 18E-F y 18G-H). Sin embargo, en todos los casos se detectó una leve positividad de CD2AP endotelial granular (Fig. 18B).

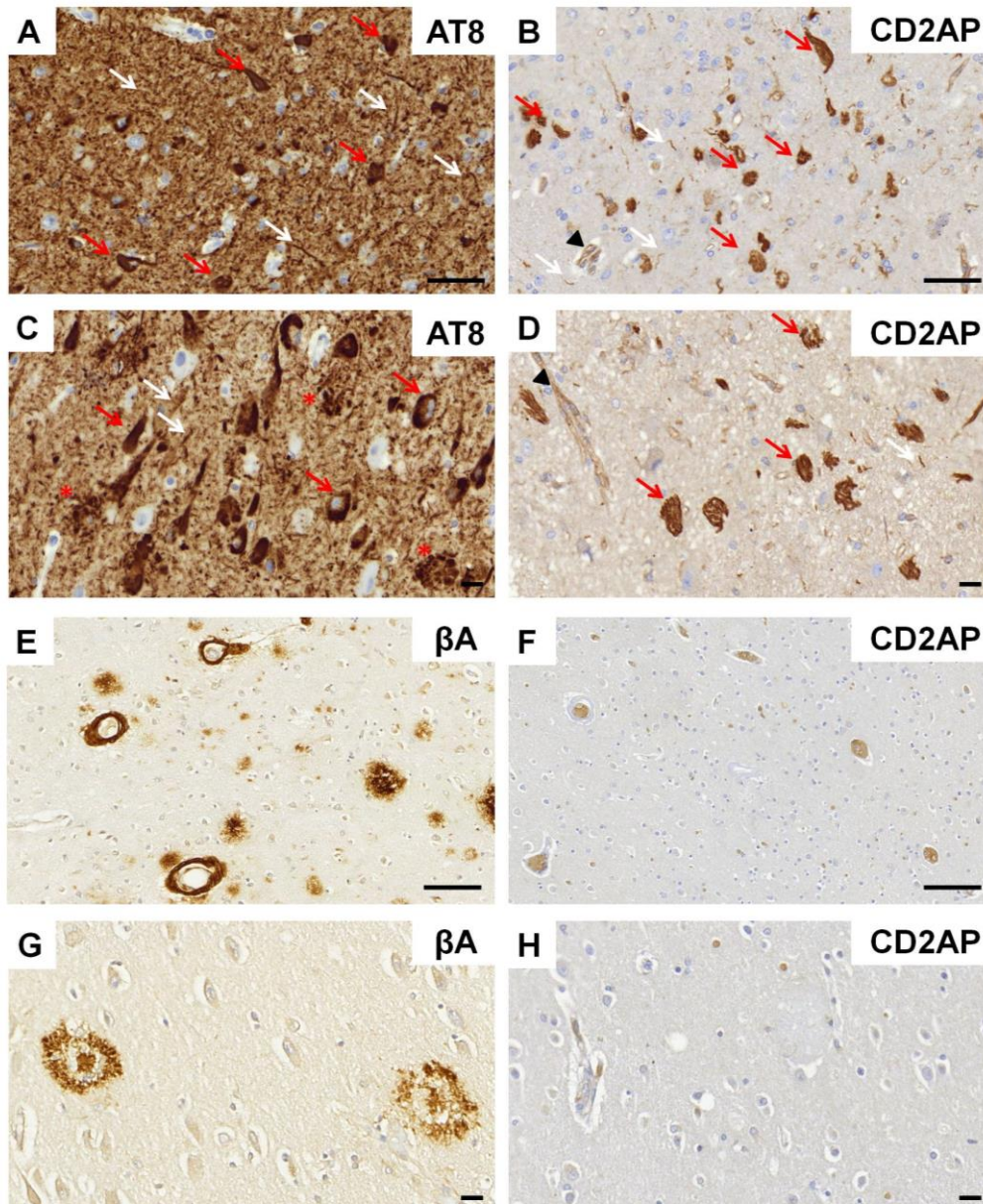


Fig 18: Imágenes representativas de secciones consecutivas de cerebros con EA (A-B, C-D, E-F y G-H). **A, C.** Se detectó expresión de Tau-AT8 en ovillos neurofibrilares de neuronas piramidales y hebras de neuropilo en dendritas (flechas rojas y blancas, respectivamente) y neuritas distróficas (asteriscos rojos). **B, D.** Se encontraron inclusiones positivas para CD2AP en neuronas piramidales (flechas rojas) y ocasionales depósitos en forma de hebras de neuropilo (flechas blancas). Además, se observó positividad granular en células endoteliales para CD2AP (punta de flecha negra). No se tiñeron neuritas distróficas descritas en las placas neuríticas con CD2AP. **E, G.** La inmunotinción de β A demostró depósitos parenquimatosos y vasculares. **F, H.** La inmunohistoquímica de CD2AP no mostró positividad parenquimatososa o vascular en esas áreas. Únicamente las células sanguíneas y endoteliales fueron positivas para CD2AP. C, D, G y H: barras de escala = 20 μ m. A, B, E y F: barras de escala = 50 μ m.

Para estudiar más a fondo la asociación encontrada, se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia de CD2AP y Tau-AT8 en secciones corticales de EA (Fig. 19), confirmando que CD2AP se colocalizaba con pTau, como lo demuestran los depósitos

intraneuronales citoplasmáticos en neuronas piramidales y ocasionales hebras de neuropilo. No se encontró expresión de CD2AP independiente de pTau (Fig. 19A). A un mayor aumento, se demostró que esta colocalización con pTau era incompleta y la expresión de CD2AP presentó un patrón granular discontinuo (Fig. 19B).

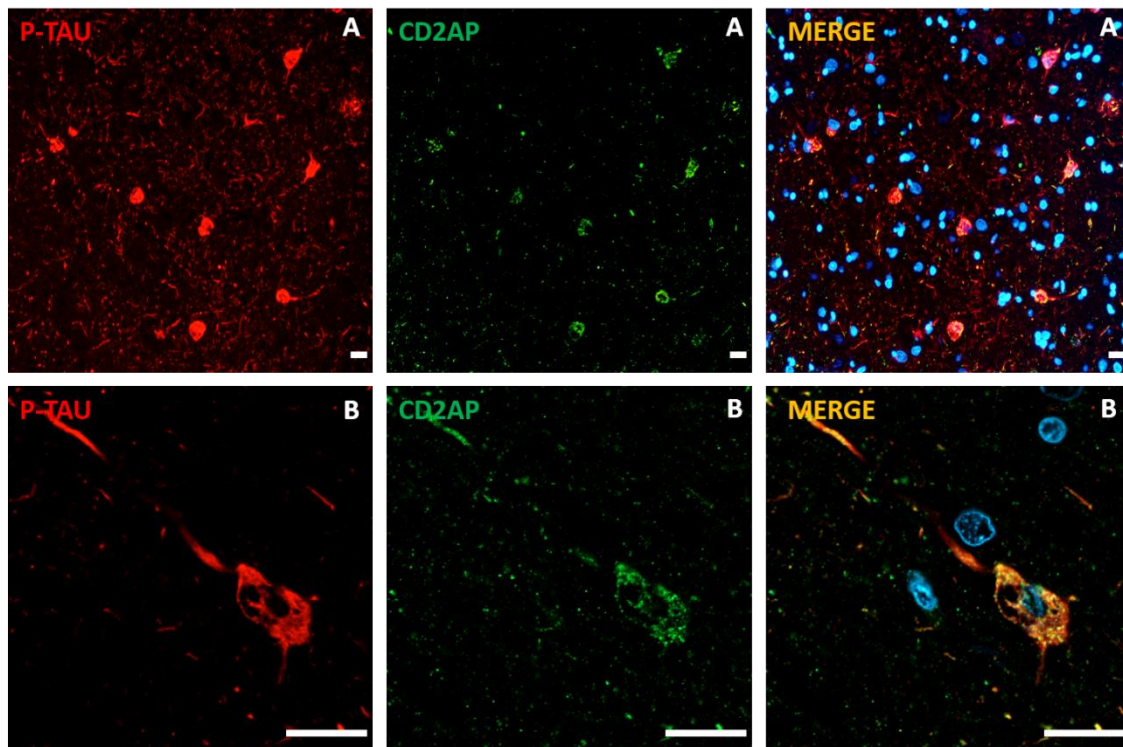


Fig. 19: Evaluación confocal de la distribución de CD2AP y Tau-AT8 en secciones corticales del cerebro de pacientes con EA. Imágenes confocales representativas que muestran la colocalización de pTau (rojo) y CD2AP (verde) en el citoplasma neuronal y en hebras de neuropilo en un caso de estadio B3 y CD2AP-3. Las imágenes fusionadas muestran la colocalización de pTau y CD2AP (amarillo). Barra de escala = 10 μ m.

El siguiente paso fue confirmar la asociación entre pTau y la distribución de CD2AP en casos de EA y controles. Para ello, ampliamos la serie de pacientes añadiendo una segunda cohorte (cohorte B, tabla 2). Los casos de las cohortes A y B (N = 60), se clasificaron según el estadio de Braak (tabla 4). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a edad o sexo entre cohortes. Considerando las dos cohortes juntas, los pacientes con EA eran significativamente mayores que los pacientes control (78.9 ± 10.8 vs 61.4 ± 10 , $p < 0.001$), pero no se encontraron diferencias en cuanto al sexo (Tabla 2). La evaluación del estadio de Braak, la fase de Thal y el criterio CERAD

permitieron la asignación del “ABC” que otorgó un riesgo de EA⁶⁶. Las dos cohortes fueron neuropatológicamente equivalentes (no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de casos clasificados según la fase Thal, estadio de Braak o CERAD). Según los criterios del NIA-AA, el 48,4% del total de casos (29/60) mostraron cambios neuropatológicos de EA intermedio (16/60) o alto (13/60) (tabla 3).

	Cohorte A	Cohorte B	Valor p	Total
N	23	37		60
Edad	78 [63–82]	80 [64–86.5]	0.373	78.5 [63.5–85]
Sexo (femenino)	12 (52.2%)	23 (62.2%)	0.445	35 (58.3%)
Fases de Thal			0.150	
A0	9 (39.1%)	12 (32.4%)		21 (35%)
A1	2 (8.7%)	5 (13.5%)		7 (11.7%)
A2	7 (30.4%)	4 (10.8%)		11 (18.3%)
A3	5 (21.7%)	16 (43.2%)		21 (35.0%)
Estadio de Braak			0.976	
B0	6 (26.1%)	9 (24.3%)		15 (25%)
B1	6 (26.1%)	9 (24.3%)		15 (25%)
B2	6 (26.1%)	9 (24.3%)		15 (25%)
B3	5 (21.7%)	10 (27.0%)		15 (25%)
Criterios de CERAD			0.131	
C0	9 (39.1%)	19 (51.4%)		28 (46.7%)
C1	6 (26.1%)	2 (5.4%)		8 (13.3%)
C2	3 (13.0%)	4 (10.8%)		7 (11.7%)
C3	5 (21.7%)	12 (32.4%)		17 (28.3%)
Riesgo de EA			0.563	
No relacionado	10 (43.5%)	12 (32.4%)		22 (36.7%)
Bajo	3 (13.0%)	6 (16.2%)		9 (15.0%)
Intermedio	7 (30.4%)	9 (24.3%)		16 (26.7%)
Alto	3 (13.0%)	10 (27.0%)		13 (21.7%)
CD2AP			0.421	
0	10 (43.5%)	15 (40.5%)		25 (41.7%)
1	9 (39.1%)	12 (32.4%)		21 (35.0%)
2	3 (13.0%)	3 (8.1%)		6 (10.0%)
3	1 (4.3%)	7 (18.9%)		8 (13.3%)

Tabla 3: Descripción demográfica y patológica de los casos y controles de la enfermedad de Alzheimer (EA) de la Cohorte A (HUVH) y la Cohorte B (Fundación CIEN). La expresión de CD2AP se clasificó de acuerdo con la puntuación descrita en la sección B.4 de Métodos y se representó esquemáticamente en la figura 17A. Se analizaron las diferencias estadísticas entre cohortes para las diferentes variables.

A continuación, se evaluó la puntuación de CD2AP en los casos de EA y en casos control, siendo comparables los resultados obtenidos de ambas cohortes (A y B) (tabla

3). Como se muestra en la figura 11, los depósitos de CD2AP se clasificaron de manera similar al estadio de Braak.

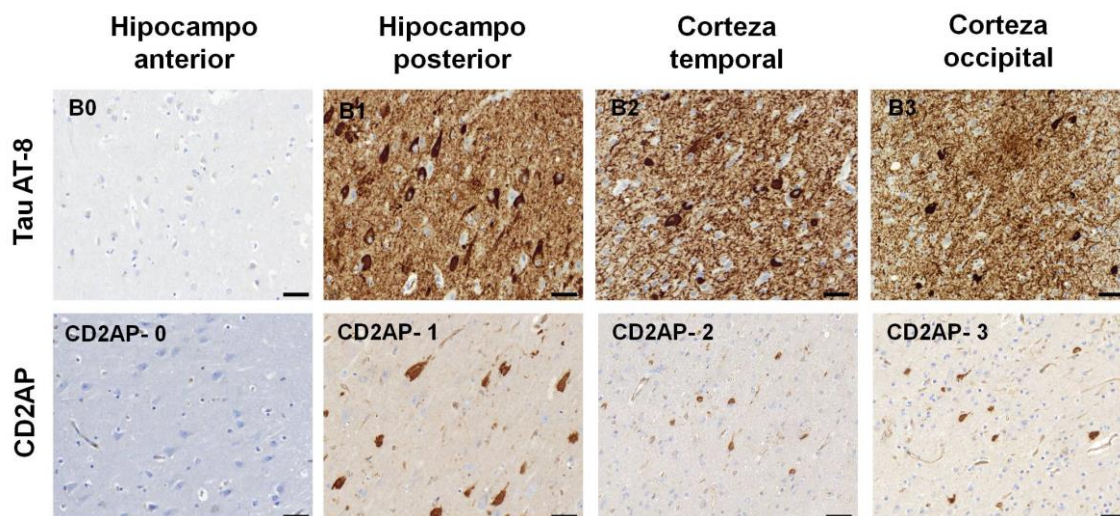


Fig. 20: Imágenes representativas de secciones consecutivas teñidas con anti-Tau-AT8 y anti-CD2AP en diferentes áreas cerebrales. Barras de escala = 50µm.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la inmunodetección de CD2AP neuronal se asociaba a los ovillos neurofibrilares identificados con pTau. Sin embargo, la positividad de CD2AP bajo forma de estructuras de tipo hebras de neuropilo fue significativamente menor que la expresión de pTau. La intensidad de la inmunotinción neuronal de CD2AP fue homogénea, independiente del riesgo de EA, aunque su extensión seguía la distribución patológica de pTau. En la figura 20 se muestra un ejemplo de los estadios de Braak y la puntuación que se otorgó para la expresión de CD2AP. Así, el 41,7% de los casos no mostraron depósitos de CD2AP (25/60), el 35% de los casos se clasificaron como CD2AP-1 (21/60), el 10% de los casos se clasificaron como CD2AP-2 (6 / 60) y, finalmente, el 13,3% de los casos cumplían criterios de puntuación CD2AP-3 (8/60) (tabla 3).

El análisis estadístico univariado reveló que la expresión de CD2AP se asociaba significativamente con la edad, la fase de Thal, el estadio de Braak, los criterios CERAD y el riesgo de EA ($p < 0.001$) (tabla 4). No obstante, después del análisis de regresión incluyendo las diferentes variables independientes, únicamente la asociación

de la expresión de CD2AP neuronal con el estadio de Braak permaneció estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (tabla 4). En este contexto, ninguno de los casos de control (B0) mostró depósito de CD2AP, mientras que el 33,33% de los casos B1 (5/15) fueron CD2AP-1. Todos los casos B2 y B3 presentaron positividad para CD2AP: el 93,33% de los casos B2 (14/15) se clasificaron como CD2AP-1 y el 6,67% como CD2AP-2 (1/15); mientras que el 13,33% de los casos B3 se clasificaron como CD2AP-1 (2/15), el 33,33% se puntuaron como CD2AP-2 (5/15) y el 53,33% de los casos B3 (8/15) mostraron la mayor expresión de CD2AP (CD2AP-3). Esta progresión jerárquica de la distribución de CD2AP con respecto al estadio de Braak se representa en la figura 21.

Asociación de CD2AP	Análisis univariado Valor p	Regresión CATREG	
		Beta \pm SE	Valor p
Edad	< 0.001	-0.097 \pm 0.081	0.237
Sexo (Femenino)	0.680	---	---
Fase de Thal	< 0.001	0.190 \pm 0.374	0.773
Estadio de Braak	< 0.001	0.495 \pm 0.230	0.006
Criterio CERAD	< 0.001	0.045 \pm 0.167	0.790
Riesgo de EA	< 0.001	0.334 \pm 0.436	0.561

Tabla 4: Asociaciones entre la puntuación de CD2AP y las características demográficas y patológicas en pacientes con EA y controles de ambas cohortes. La regresión CATREG se evaluó utilizando sólo las variables significativas del análisis univariado. Beta \pm SE: coeficientes beta estandarizados con la correspondiente estimación del error estándar. Los números en negrita indican diferencias estadísticamente significativas.

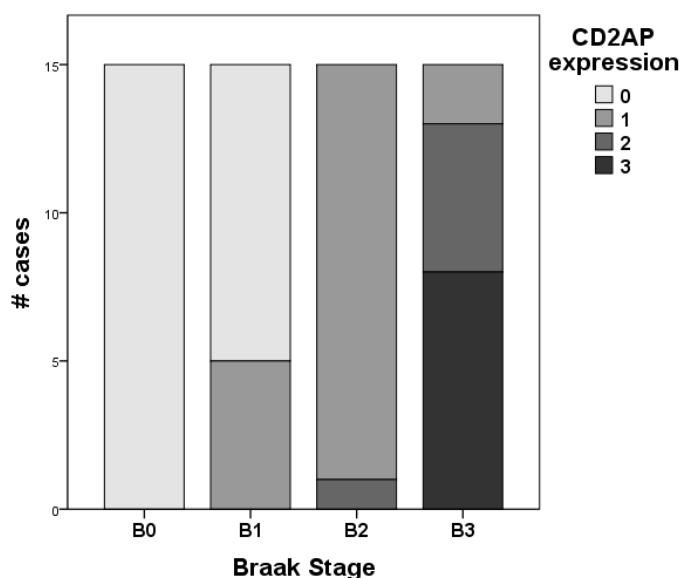


Fig. 21: Diagrama de barras que representa el score de CD2AP según el estadio de pTau de Braak.

B.2. Inmunopositividad de CD2AP en otras taupatías

Para analizar si la asociación entre pTau y CD2AP se daba también en otras taupatías más allá de la EA, se estudió la distribución de CD2AP en 9 casos de PSP, 5 casos de DCB y 7 casos de EPi (Tabla 2). Los pacientes con PSP y EPi eran significativamente mayores que los pacientes control (PSP = 74.2 años \pm 9.1 y PiD = 75.1 años \pm 9.7 frente a controles = 61.4 años \pm 10, $p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al sexo entre grupos (Tabla 2).

Se evaluó la presencia de CD2AP en neuronas, células gliales y oligodendrogiales en estos casos. Los resultados evidenciaron únicamente inclusiones neuronales esféricas de CD2AP similares a los cuerpos de Pick, algunas inclusiones de tipo ovillo neurofibrilar y de tipo hebras de neuropilo en 6/7 casos de EPi, mientras que no se encontraron inclusiones neuronales o gliales de CD2AP en ninguno de los casos de PSP o DCB (Fig. 22). En ninguno de los casos se detectó positividad granular neuronal de tipo preovillo para CD2AP.

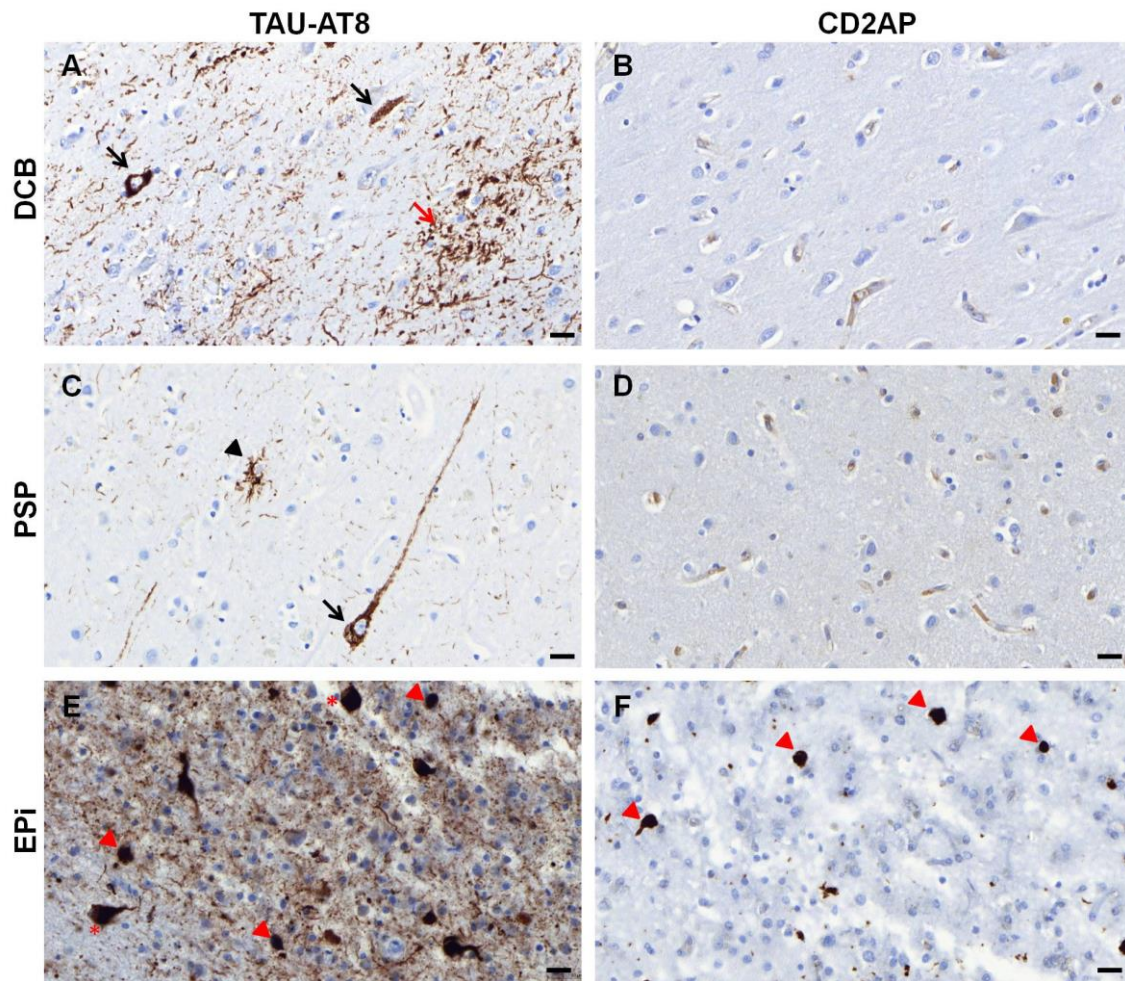


Fig. 22: Imágenes de cortes consecutivos representativas de diferentes tauopatías: DCB (A-B), PSP (C-D) y EPI (E-F). **A, C y E.** La inmunohistoquímica de Tau AT-8 mostró inmunoreactividad citoplásmica granular difusa (preovillo, flecha negra) en neuronas y placas astrocíticas (flecha roja) en los casos de **DCB (A)**, astrocitos en forma de penacho (punta de flecha negra) y preovillos (flecha negra) en muestras de **PSP (C)** y ovillos neurofibrilares (asterisco) y cuerpos de Pick (puntas de flecha roja) en muestras de **EPI (E)**. **B, D y F.** La inmunohistoquímica de CD2AP no mostró ninguna positividad neuronal o glial en las muestras de **DCB o PSP (B, D)**, mientras que en las muestras de **EPI** se identificaron inclusiones esféricas similares a cuerpos de Pick positivas para CD2AP (puntas de flecha rojas) **(F)**. A-F: barras de escala = 20 μ m.

Dada la asociación sugestiva de la expresión de CD2AP con enfermedades asociadas a Tau-3R como la EA y la EPI, comparamos la inmunohistoquímica de CD2AP y Tau-3R en secciones consecutivas en casos de EPI. Los resultados mostraron que la positividad neuronal de CD2AP fue significativamente mayor que la de Tau-3R (40.7 ± 26.3 inclusiones de CD2AP/10 CGA frente a $14,4 \pm 11,9$ depósitos de Tau-3R/10 CGA, $p=0.033$) y únicamente con CD2AP se identificaron hebras de neuropilo, mientras que no se observaron con Tau-3R (Fig. 23).

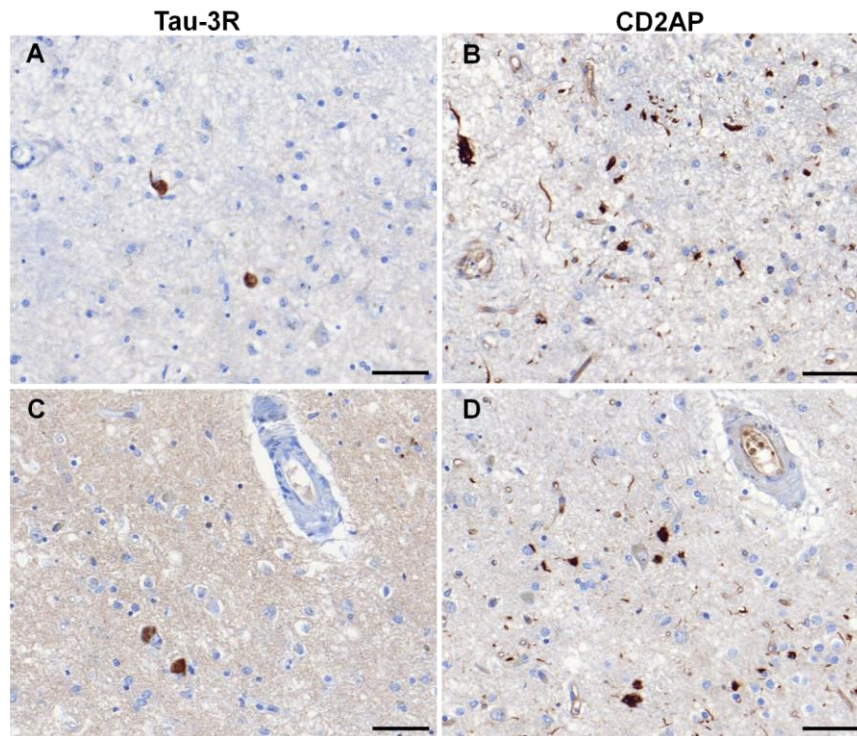


Fig. 23: Imágenes representativas de secciones consecutivas de muestras de cerebro con EPI (A-B y C-D). **A y C.** La positividad de Tau-3R se restringió a depósitos neuronales aislados y no se identificaron hebras de neuropilo con esta tinción. **B y D.** La inmunohistoquímica de CD2AP evidenció depósitos neuronales e inclusiones en forma de hebras de neuropilo. Barras de escala = 50 μ m.

DISCUSIÓN

El depósito anómalo de proteínas en el cerebro desencadena procesos patológicos que condicionan la expresión y localización de biomoléculas específicas, tanto a nivel cerebral como a nivel sistémico. Estas moléculas pueden tener utilidad clínica como biomarcadores para un mejor diagnóstico y pronóstico de las enfermedades implicadas, y podrían considerarse nuevas dianas terapéuticas y/o ayudar a esclarecer los procesos patológicos subyacentes. En este sentido, el objetivo global de esta tesis fue identificar proteínas implicadas en la β -amiloidosis cerebral y determinar su expresión y distribución en el cerebro humano. En particular, basamos este trabajo en el estudio de proteínas implicadas en patologías asociadas al depósito de β A, como la AAC y la EA.

A) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE APOE, APOJ Y APOA-I EN LA AAC

Todavía no se conocen en profundidad las vías patogénicas que dan lugar al desarrollo de la EA, la AAC o ambas. En lo referente al depósito de β A en el cerebro se han descrito múltiples mecanismos de por qué ocurre. Una de las hipótesis más aceptadas que intenta explicar el depósito esporádico de β A cerebrovascular se refiere al fallo de eliminación de proteínas del cerebro¹⁸⁵. Los vasos cerebrales son el principal sistema de eliminación del β A cerebral, que se evacúa a través de las vías de drenaje perivascular y a través de la BHE. El depósito fibrilar y compacto de β A en las paredes de los vasos se ha relacionado con anomalías en la red de los vasos cerebrales, que posteriormente pueden comprometer la integridad de la BHE. De hecho, la consecuencia patológica más relevante de la AAC es el desarrollo de una HIC en las áreas corticales y/o subcorticales. Además, la recurrencia de la HIC es una complicación común en pacientes con AAC, lo que resulta en tasas elevadas de mortalidad y discapacidad¹²⁶. Sin embargo, los mecanismos de rotura de los vasos que desencadenan una HIC en los pacientes con AAC tampoco son conocidos.

El objetivo principal de nuestro estudio fue analizar la expresión inmunohistoquímica de proteínas que codepositan con β A en cerebros que muestran diferentes patrones de localización de este depósito. En particular, se analizaron las apolipoproteínas específicas, ApoE, ApoJ y ApoA-I, que pueden influir en la agregación y eliminación de los depósitos insolubles de amiloide^{124, 151, 186-187} y, por lo tanto, podrían ser relevantes en la distribución del β A cerebral.

La ApoE se produce a nivel cerebral y modula múltiples vías que pueden afectar la cognición, como la homeostasis del colesterol y lípidos, la función sináptica, el metabolismo de la glucosa, la neurogénesis, la función mitocondrial, la fosforilación de tau, la atrofia neuronal, la neuroinflamación y el metabolismo y la agregación de β A¹⁸⁸. Estudios inmunohistoquímicos previos realizados en cerebros con EA evidenciaron la presencia de ApoE en depósitos parenquimatosos y vasculares, que se correlacionaban con los de β A^{106, 116, 189}. Los resultados de nuestro estudio confirman la expresión inmunohistoquímica de ApoE en paredes vasculares de pacientes con AAC y en depósitos parenquimatosos en pacientes con placas neuríticas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de ApoE en las arterias meníngeas con o sin AAC, aunque se observó una mayor tendencia a la presencia de ApoE en los vasos corticales de cerebros con AAC que en los cerebros sin AAC.

Varios artículos han demostrado que el genotipo *APOE* modifica la distribución cerebrovascular de β A en individuos con EA^{190, 191}. En este sentido, se analizó si el genotipo *APOE* también podría influir en la expresión de las apolipoproteínas del estudio en casos de AAC. Aunque *APOE ϵ 4* es un factor de riesgo bien conocido para AAC^{190, 192}, no se pudo demostrar esta asociación en nuestro estudio, probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra del grupo control (casos sin patología de β A). Sin embargo, entre los casos de AAC, encontramos que el genotipo *APOE ϵ 4* estaba más representado en pacientes con AAC tipo I, mientras que los pacientes con AAC

tipo II presentaban una mayor frecuencia de *APOE*ε2, de acuerdo con lo descrito en la literatura^{3, 118}. No se pudo encontrar una asociación significativa entre la presencia inmunohistoquímica de ApoE, ApoJ o ApoA-I y el genotipo *APOE*, excepto por una tendencia estadística que apuntaba hacia un vínculo entre el genotipo *APOE*ε2 y una mayor expresión de ApoE en las arterias corticales. De hecho, se ha descrito niveles más altos de proteína ApoE en el plasma de portadores de *APOE*ε2 respecto al resto de genotipos (*APOE*ε3 y *APOE*ε4) en pacientes con AAC¹⁵⁰. Por otro lado, se ha propuesto que la presencia de *APOE*ε4 o *APOE*ε2 aumenta el riesgo de ocurrencia de HIC lobar¹⁹³. Estudios patológicos previos demostraron que *APOE*ε2 se asociaba a la rotura de los vasos relacionada con AAC¹³¹, mientras que *APOE*ε4 se asoció con la cantidad de amiloide vascular¹⁹². En nuestra cohorte, los pacientes con AAC e HIC eran más comúnmente portadores de *APOE*ε2 en comparación con los pacientes con AAC sin HIC, validando los resultados descritos anteriormente¹³². Además de esto, la presencia de ApoE en los vasos corticales fue significativamente mayor en los pacientes que sufrieron un HIC, después de ajustar por el genotipo *APOE* y la edad. Estos datos sugieren el posible papel de esta apolipoproteína en la desestabilización y la alteración de los vasos cerebrales, como se propone en diferentes modelos experimentales¹⁹⁴⁻¹⁹⁵.

ApoJ es una proteína heterodimérica multifuncional que actúa como una chaperona natural y se une al βA en el LCR y plasma¹¹¹. El aumento de ApoJ en plasma se ha asociado con una mayor prevalencia y gravedad de EA¹³⁶. En cerebros con EA, ApoJ y βA codepositan en lesiones cerebrovasculares y parenquimatosas^{105-106, 134}. Una vez más, los resultados de nuestro estudio concuerdan con los datos previamente publicados, ya que se identifican claramente niveles más altos de ApoJ en los vasos cerebrales de los casos de AAC y en los depósitos parenquimatosos de tipo “neurítico” y “difuso” en los casos que presentan placas de βA. Sin embargo, vale la pena mencionar que también se encontraron depósitos de tipo “difuso” de ApoJ y ApoE en

algunos casos control, en los que no se detectaron depósitos de β A en parénquima. Sería necesario el uso de métodos de inmunodetección más sensibles (por ejemplo, el uso de anticuerpos β A que reconocen diferentes epítomos) para confirmar estos resultados. El aumento de los niveles de ApoJ se ha postulado como una respuesta protectora contra la acumulación aberrante de β A en el cerebro. Sin embargo, hay resultados contradictorios en la literatura sobre el papel protector de ApoJ. La eliminación de *CLU* en un modelo ratón transgénico de EA resultó en una exacerbación del depósito vascular de β A, mientras que el depósito parenquimatoso se redujo notablemente¹⁴⁰. Sin embargo, la administración intravenosa de proteína ApoJ recombinante humana o de un péptido mimético de ApoJ promovió una reducción en el acúmulo de β A parenquimatoso y vascular en modelos experimentales de EA^{141, 196}. Así, la función de ApoJ en el cerebro aún debe esclarecerse. En el estudio actual, en contraste con ApoE, la presencia de ApoJ en vasos leptomenígeos y corticales se asociaba a la AAC, aunque no se encontró asociación significativa entre los niveles cerebrovasculares de ApoJ y la aparición de HIC.

Finalmente, ApoA-I, componente importante de las HDL en plasma que desempeña un papel crucial en el transporte inverso de colesterol, puede cruzar la BHE¹⁴², ya que se ha encontrado en LCR y en cerebro¹⁴³. De hecho, en estudios previos en cerebros con EA se detectó ApoA-I en las placas neuríticas^{106, 116}, aunque se desconoce si esta proteína proviene de la sangre periférica o si determinadas células cerebrales podrían llegar a producirla como sucede con ApoE y ApoJ¹⁹⁷. En nuestro estudio inmunohistoquímico, se encontró ocasionalmente ApoA-I en forma de depósitos parenquimatosos cerebrales, siendo la positividad de ApoA-I menos extensa que la de ApoE y ApoJ en las arterias menígeas y corticales. No hubo asociación entre los niveles de ApoA-I y el depósito arterial de β A.

Otro objetivo importante del estudio fue determinar si el depósito de estas proteínas era específico de patología con afectación capilar por el β A (AAC tipo I) o no (AAC tipo

II). De hecho, la relevancia clínica de esta clasificación neuropatológica de la AAC aún está en debate. Por ejemplo, Mäkelä y cols¹⁹⁸ describieron que la AAC tipo I estaba relacionada con la gravedad de la AAC y con un cuadro clínico y neuropatológico de EA más severo, mientras Boyle y cols⁸² encontraron que el deterioro cognitivo no estaba asociado a una afectación capilar de la AAC. En este trabajo, la afectación capilar por AAC no se asoció con la gravedad patológica de la AAC ni la EA y el subtipo de AAC no se relacionó con la aparición de HIC. Por otro lado, aunque el patrón biológico de ambos subtipos de AAC no se ha estudiado ampliamente¹⁹⁹, la expresión de estas apolipoproteínas en vasos cerebrales afectados por el depósito de β A ya se ha descrito con anterioridad^{106, 189}, sin profundizar en un posible patrón de distribución diferencial según la clasificación patológica de la AAC. En nuestro estudio, se confirmó la presencia de las tres apolipoproteínas no sólo en las arterias sino también en los capilares de los casos de AAC. Además, los niveles de expresión endotelial de ApoE y ApoJ, así como los de ApoA-I, fueron mayores en los capilares de la AAC tipo I que en los capilares de tipo II. De hecho, la expresión endotelial intensa con tinción de pared gruesa y acompañada en ocasiones de depósitos perivasculares únicamente se observó en los capilares de la AAC tipo I, mientras que en la AAC tipo II sólo se encontró expresión endotelial sin aumento del grosor de la pared de los capilares. Curiosamente, estos resultados destacan una asociación específica relevante entre la presencia de ApoA-I y el β A capilar. Sería interesante saber si esta ApoA-I tiene un origen periférico y es atraído por el β A microvascular o si se trata de un mecanismo de expresión específico de las células endoteliales. Además, también se detectaron niveles más altos de ApoE y ApoA-I en capilares de pacientes que sufrieron una HIC, independientemente del subtipo de AAC, lo que sugiere una posible implicación de la acumulación de estas apolipoproteínas en la alteración de algunas propiedades asociadas a la integridad de la BHE.

Este estudio presenta ciertas limitaciones, como el pequeño tamaño muestral de los subgrupos (más evidente para los grupos sin AAC) o el análisis de diferentes áreas corticales, que puede haber influido en la evaluación de la inmunohistoquímica de las diferentes apolipoproteínas. Se necesitarán estudios más amplios para evaluar el impacto del codepósito de estas apolipoproteínas en patologías relacionadas con el β A y la aparición de HIC asociada a la AAC.

B) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE CD2AP EN LA EA

En el segundo estudio, se evaluó la distribución y presencia de la proteína CD2AP en tejido cerebral de pacientes con EA y controles procedentes de dos bancos de tejidos neurológicos independientes. El interés inicial en el estudio de CD2AP nació de su posible asociación con el depósito de β A cerebral descrita en modelos experimentales¹⁸⁰⁻¹⁸², así como su posible funcionalidad a nivel de la BHE¹⁷³. En este sentido, el objetivo original fue comprobar un posible vínculo de la expresión de esta proteína con el depósito β A vascular y/o a nivel de placas neuríticas propias de la EA. Los avances en genética humana han revelado diferentes variantes genéticas, entre ellas en genes como CD2AP, asociadas con el riesgo de EA. Aunque dicha asociación ha sido bien documentada en múltiples cohortes^{156-160, 176}, la expresión de la proteína CD2AP en esta enfermedad aún no ha sido confirmada.

CD2AP es una proteína multidominio de andamiaje implicada en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. CD2AP ha sido investigada en profundidad en relación a la patología renal, ya que, se expresa principalmente en los podocitos glomerulares, que componen la barrera de filtración de proteínas del riñón. En cuanto a la función cerebral de CD2AP, como se ha comentado anteriormente, se ha relacionado con la sinapsis; CD2AP podría modular la longitud y complejidad de las neuritas, el número de filopodios del cono de crecimiento en las neuronas y se encontraría regulada positivamente durante el crecimiento del axon de las neuronas no lesionadas in

vitro¹⁷⁰. Por otro lado, un estudio en ratones con ausencia de *CD2AP* puso de manifiesto una reducción de la integridad de la BHE, confirmando que esta proteína es necesaria para el mantenimiento de la BHE²⁰⁰.

En nuestro estudio, se confirmó la inmunopositividad granular para *CD2AP* en el endotelio del cerebro humano. Sin embargo, el hallazgo más interesante fue la presencia de inclusiones neuronales de *CD2AP* morfológicamente similares a ovillos neurofibrilares en el hipocampo y la corteza temporal y occipital de los cerebros con EA. A pesar de que las variantes rs9349407¹⁷⁷ y rs10948363¹⁷⁸ de *CD2AP* estén asociadas a mayor número de placas neuríticas y que esto se haya relacionado con el depósito de β A, en nuestra cohorte de EA no se detectaron depósitos de *CD2AP* en paredes vasculares positivas para β A ni en forma de placas parenquimatosas. Es decir, nuestros resultados no apoyaban una vinculación directa entre la expresión cerebral de *CD2AP* y el metabolismo de β A, en consonancia con estudios in vivo previos que demostraban que la pérdida de función de *CD2AP* no afectaba a los niveles totales de β A o la carga de placas de amiloide en un modelo transgénico de EA¹⁸⁰.

Por el contrario, en la cohorte de cerebros con EA se encontró *CD2AP* específicamente en regiones con una presencia evidente de depósitos de pTau como son los ovillos neurofibrilares y hebras de neuropilo. Curiosamente, tampoco se identificaron depósitos de *CD2AP* de tipo neuritas distróficas presentes en las placas neuríticas de los pacientes con EA. Gracias al estudio de inmunofluorescencia se pudo demostrar que *CD2AP* colocalizaba a nivel intraneuronal con la proteína pTau en el hipocampo del cerebro con EA.

En base a este resultado, se analizó la expresión de *CD2AP* en una cohorte de cerebros de dos centros diferentes con representación equilibrada de las distintas fases de distribución de pTau (estadios de Braak⁵⁸). En primer lugar, se pudo evidenciar la ausencia de depósitos intraneuronales de *CD2AP* en todos los casos control. En segundo lugar, en las muestras de EA, la positividad neuronal de *CD2AP*

se asoció con el estadio de Braak, independientemente de la edad y otras características patológicas. De hecho, aunque la expresión de CD2AP se asociaba significativamente con el riesgo de EA en el análisis univariante, los resultados corregidos por las diferentes variables asociadas confirmaron que esto podía atribuirse a la fuerte asociación de la expresión de CD2AP con el estadio de Braak. Estos hallazgos mostraban que los depósitos de CD2AP estaban relacionados con la patología tau siguiendo una progresión jerárquica en las áreas estudiadas (hipocampo, corteza temporal y corteza occipital). Cabe destacar que la extensión del depósito neuronal de CD2AP fue inferior o igual, pero nunca mayor que los depósitos de pTau, sugiriendo que la aparición de los depósitos de CD2AP seguiría una progresión posterior a los de pTau en la EA.

Diferentes estudios ya han propuesto que la regulación de CD2AP podría estar relacionada con la toxicidad de tau y la apoptosis neuronal. Por ejemplo, se ha descrito que *Cindr* (ortólogo de mosca de CD2AP) juega un papel en la homeostasis neuronal y la función sináptica¹⁸⁴ y que la pérdida de *Cindr* en un modelo de *Drosophila* agrava la toxicidad mediada por tau¹⁸³. Estos estudios sugieren que la modulación de CD2AP podría proteger contra la EA. No obstante, estos autores describieron una expresión ubicua de *Cindr* en células gliales y neuronas, con un enriquecimiento particular en las terminales presinápticas¹⁸⁴. Como este patrón de expresión difiere claramente de la distribución que encontramos en el tejido humano, restringido a células endoteliales, neuritas aisladas e inclusiones neuronales similares a los ovillos neurofibrilares, la función de *Cindr* en *Drosophila* puede no ser comparable con la función de CD2AP en el cerebro humano. Por otro lado, estudios en humanos también han sugerido un vínculo entre CD2AP y la patología tau, ya que, el polimorfismo rs9381563 de *CD2AP* se asoció a niveles alterados de pTau en el LCR¹⁷⁵. Además, la variante *CD2AP* rs10948363 mostró una asociación con la presencia histológica de ovillos neurofibrilares²⁰¹. Hasta la fecha, se desconoce el patrón de expresión de la proteína CD2AP en pacientes portadores de estas variantes

genéticas. Sin embargo, los datos disponibles del *Genotype-Tissue Expression Project*, donde se describen los efectos genéticos sobre los niveles de expresión génica²⁰², muestran que los alelos de riesgo de CD2AP están asociados con una mayor expresión génica en varios tejidos, incluido el cerebro. Estas observaciones, junto con nuestros resultados que muestran niveles insignificantes de expresión de CD2AP neuronal en casos con estadios de Braak más bajos y una mayor presencia de éstos en casos con un mayor riesgo neuropatológico de EA, pueden abrir la posibilidad de que una mayor expresión de CD2AP implique una función protectora frente a la toxicidad asociada a la patología pTau en la EA, en contraste con la hipótesis anterior^{183-184, 203}. Sin embargo, para esclarecer este punto sería interesante determinar los niveles totales o solubles de expresión de CD2AP por técnicas diferentes a la inmunohistoquímica en pacientes y controles. De hecho, un estudio anterior mostró que la expresión del gen CD2AP estaba disminuida en linfocitos en sangre periférica de casos de EA esporádica²⁰³. Cabe destacar que otras proteínas codificadas por genes identificados como de riesgo para la EA, así como aquellas con funciones celulares endocíticas, también se han asociado con la patología de tau. Este es el caso, por ejemplo, de PICALM (proteína de ensamblaje de clatrina que se une a fosfatidilinositol), que también colocaliza con ovillos neurofibrilares y cuyos niveles se encontraron disminuidos en cerebros con EA²⁰⁴. Los autores de este estudio demostraron que el procesamiento anormal de PICALM estaba relacionado con un deterioro de la autofagia en la EA y en tauopatías sin patología A β , como DCB y EPI²⁰⁵. Además, en un modelo de tauopatía murina, la haploinsuficiencia de PICALM indujo una patología de tau exacerbada a través de la desregulación de la autofagia²⁰⁶. En general, el equilibrio entre los niveles de proteínas solubles y las inclusiones proteicas insolubles asociadas a tau parece ser un factor crítico que podría influir en la toxicidad de los ovillos neurofibrilares, donde CD2AP también podría tener un papel relevante que debería ser explorado en futuros estudios. De hecho, las redes autofágicas-endolisosomales realizan funciones importantes en la acumulación de tau,

incluida la eliminación de formas neurotóxicas de tau y pTau en sitios específicos a través del sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS). La desregulación de estos procesos autofágicos-endolisosomales se ha demostrado en diferentes tauopatías²⁰⁷. En este sentido, CD2AP se une a ubiquitina²⁰⁸ y también se ha propuesto que podría regular la función UPS en la transmisión sináptica¹⁸⁴.

Debido al vínculo observado entre la patología CD2AP y pTau, también se analizó la expresión de la proteína CD2AP en el cerebro de pacientes con otras tauopatías (CBD, PSP u EPI). Nuestros resultados mostraron que sólo la EPI presentaba depósitos de CD2AP que se asemejaban a los cuerpos de Pick en el citoplasma de las neuronas. La EPI es una demencia en la que se encuentran principalmente isoformas 3R de pTau, mientras que en la EA se identifican cantidades equivalentes de isoformas 3R y 4R⁶⁴⁻⁶⁵. Dado que en las áreas estudiadas no se observó inmunorreactividad neuronal de CD2AP en forma de previllos o inclusiones en penacho en los astrocitos de los casos de PSP ni placas astrocíticas u ovillos neurofibrilares en casos de DCB, se analizó únicamente si la isoforma 3R podría interactuar específicamente con CD2AP. En este sentido, encontramos que CD2AP se asociaba sólo parcialmente con la inmunorreactividad de Tau-3R, ya que, el número de depósitos neuronales de Tau-3R era inferior al de los depósitos neuronales de CD2AP. Se encontraron además neuritas positivas para CD2AP en ausencia de positividad neurítica para Tau-3R, lo que permitió especular que diferentes modificaciones de procesamiento y a nivel postraduccional podrían explicar esta asociación específica entre CD2AP y pTau. Arakhamia y cols²⁰⁹ compararon filamentos de tau modificados post-traduccionalmente en EA y DCB, encontrando diferencias notables en los procesos de mal plegamiento y autoensamblaje de las fibrillas. De hecho, se han encontrado diferentes patrones de migración electroforética de depósitos de tau en la DCB o la PSP⁶³ y la EPI²⁰¹⁰, en comparación con los filamentos helicoidales emparejados encontrados en la EA. También se han analizado las características ultraestructurales de los filamentos de tau en estas tauopatías²¹¹, revelando diferencias en la forma, el tamaño y la

conformación. Las características propias de los filamentos helicoidales emparejados de la EA podrían explicar la asociación específica entre pTau y CD2AP. Otra explicación que relacionaría ambas proteínas podría ser la edad del ovillo: en la EA hay un predominio de 4R en el preovillo (en el que no hay formación de fibrillas e inmunohistoquímicamente se observa un depósito granular de pTau, previo al ovillo neurofibrilar) mientras que en el ovillo fantasma (depósito de pTau que persiste tras la muerte de la neurona, etapa final del ovillo neurofibrilar) hay un predominio de 3R. El ovillo neurofibrilar se encontraría en un punto medio entre ambas figuras (preovillo y ovillo fantasma), y podría tener un predominio variable de estas isoformas en función de su tiempo de evolución²¹². Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la presencia de inclusiones neuronales CD2AP podría estar relacionada con una estructura de ovillo neurofibrilar más madura o avanzada, debido a la ausencia de inclusiones de CD2AP en taupatías con predominio 4R (CBD y PSP).

El estudio de CD2AP realizado en esta tesis tiene algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta. Sólo se realizaron estudios de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia, mientras que el análisis bioquímico para determinar la expresión génica y proteica de los niveles de CD2AP en el cerebro, así como en sangre y LCR, habría sido extremadamente revelador. A pesar del esfuerzo de recolectar cohortes multicéntricas, obteniendo un tamaño muestral significativo para los casos de EA, no fue posible hacerlo para enfermedades poco frecuentes como la PSP, la DCB y la EPI. El tamaño de la muestra de estos grupos fue una limitación para el análisis estadístico, permitiendo resultados principalmente cualitativos y descriptivos. Además, en estos casos, únicamente se pudieron estudiar las áreas frontales y parietales, aunque el giro dentado o el troncoencéfalo hubieran sido regiones interesantes a analizar. La ampliación del análisis a enfermedades neurodegenerativas independientes de tau caracterizadas por la agregación de alfa-sinucleína (enfermedades con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica) o TDP43 (esclerosis lateral amiotrófica, FTLTDP43) podría extender el conocimiento del posible papel de CD2AP en la

neurodegeneración. Finalmente, dado que el genotipo *APOE* está ligado a la acumulación cerebral de $\beta A^{213-214}$ pero también es un factor de riesgo para la neurodegeneración de tau independientemente de $\beta A^{215-216}$, sería interesante analizar el posible efecto de *APOE* sobre el depósito neuronal de CD2AP en las diferentes tauopatías en futuros estudios.

En conclusión, el estudio inmunohistoquímico de CD2AP mostró una asociación de CD2AP con las inclusiones de pTau en la EA y la EPI pero no en la DCB o la PSP. Se trata de un estudio descriptivo que no puede establecer una relación causal entre los depósitos neuronales de CD2AP y el riesgo de EA. La realización de estudios funcionales ayudaría a dilucidar las consecuencias del incremento en la expresión de CD2AP o su acumulación en neuronas en la EA. Sin embargo, determinar su papel en condiciones patológicas parece relevante para esclarecer los eventos moleculares involucrados en la formación del ovillo neurofibrilar o incluso una oportunidad para el diagnóstico o tratamiento de las taupatías. En este sentido, analizar experimentalmente el efecto del tratamiento con moduladores de CD2AP, algunos de ellos previamente probados para glomeruloesclerosis focal y segmentaria²¹⁷⁻²¹⁸, podría ser una estrategia para determinar la posible modulación de la conformación y toxicidad de los ovillos neurofibrilares en la EA y la EPI. Además, debido a que los biomarcadores de LCR basados en la detección de tau total y pTau han demostrado utilidad clínica en el diagnóstico de EA²¹⁹⁻²²⁰, la determinación de los niveles de CD2AP en el LCR en combinación con estos marcadores, podría contribuir al diagnóstico diferencial de las taupatías.

CONCLUSIONES

1. Las apolipoproteínas ApoE, ApoJ y ApoA-I se distribuyen de manera diferencial en cerebros con patología β A.
 - 1.1 La presencia de ApoE y ApoJ se asoció tanto al depósito de β A en capilares como a placas neuríticas. La inmunodetección de ApoJ también se asoció significativamente al depósito de β A vascular en vasos meníngeos y corticales, así como a placas difusas a nivel parenquimatoso. En cambio, ApoA-I sólo se asoció con AAC de tipo I, con afectación capilar.
 - 1.2 La presencia de ApoE en las arterias corticales fue un factor independiente para la aparición de HIC en pacientes con AAC. Sin embargo, no se encontró asociación entre el genotipo *APOE* y el depósito vascular o parenquimatoso de ApoE, ApoJ y ApoA-I.
 - 1.3 El alelo *APOE* ϵ 2 se encontró con mayor frecuencia en los casos de AAC con HIC que en los casos de AAC sin HIC. Además, el genotipo *APOE* ϵ 4 estaba más representado en pacientes con AAC tipo I, mientras que los pacientes con AAC tipo II presentaban *APOE* ϵ 2 con mayor frecuencia.
 - 1.4 Serán necesarios futuros estudios complementarios para evaluar el impacto del codepósito de estas apolipoproteínas en patología β A y en la HIC asociada a AAC.

2. El análisis inmunohistoquímico de la proteína asociada a CD2 (CD2AP) ha demostrado la presencia de dicha proteína en tejido cerebral bajo forma de depósitos intraneuronales morfológicamente similares a ovillos neurofibrilares en pacientes con EA, sin evidencia de CD2AP en sujetos control a excepción de la expresión en células endoteliales.
 - 2.1 CD2AP colocaliza con pTau de manera incompleta, y su distribución sigue un patrón jerárquico en la misma dirección que el estadio de Braak, siempre sucediendo al depósito de pTau.

- 2.2 Existe una asociación significativa entre la presencia de inclusiones intraneuronales de CD2AP y los estadios de Braak, independientemente de la edad y otras variables neuropatológicas.
- 2.3 No existe asociación entre el depósito de CD2AP y el de β A parenquimatoso o vascular (AAC).
- 2.4 CD2AP se encuentra, además de en EA, en EPi (taupatía 3R), pero no en otras taupatías 4R estudiadas como la DCB y la PSP.
- 2.5 Serán necesarios futuros estudios funcionales para entender la implicación de los depósitos intraneuronales de CD2AP en la EA y EPi en la neurodegeneración asociada a estas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yamada M, Naiki H. Cerebral amyloid angiopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012;51:41-78. Doi: 10.1016/B978-0-12-385883-2.00006-0.
2. Revesz T, Holton JL, Lashley T, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol*. 2009;118(1):115-130. Doi:10.1007/s00401-009-0501-8.
3. Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Mar;61(3):282–93. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0366-2>.
4. Yamada M, Tsukagoshi H, Otomo E, Hayakawa M. Cerebral amyloid angiopathy in the aged. *J Neurol* 1987;234: 371-376. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00314080>.
5. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Frosch MP, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 2017 Jul 1;140(7):1829–50. Doi: 10.1093/brain/awx047.
6. Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm* 2002; 109:813-836. Doi: 10.1007/s007020200068.
7. Greenberg SM. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. New York: Harcourt Inc., 2004;693-697. Doi: 10.1001/jama.1987.03390070104036.
8. Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(2):124-137. Doi:10.1136/jnnp-2011-301308.
9. Vales-Montero M, García-Pastor A, Iglesias-Mohedano AM, Esteban-de Antonio E, Salgado-Cámara P, García-Domínguez JM, et al. Cerebral amyloid angiopathy-related transient focal neurological episodes: A transient ischemic attack mimic with an increased risk of intracranial hemorrhage. *J Neurol Sci*. 2019 Nov 15;406:116452. Doi: 10.1016/j.jns.2019.116452.

10. Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, Wilson RS, Bennett DA, Schneider JA. Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):320–7. Doi: 10.1002/ana.22112.
11. Greenberg SM. Cerebral Amyloid Angiopathy and Vessel Dysfunction. *Cerebrovasc Dis*. 2002;13(2):42-47. Doi:10.1159/000049149 43.
12. Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology*. 1996;46(6):1592-1596. Doi: <https://doi.org/10.1212/WNL.46.6.1592>.
13. Biffi A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: a systematic review. *J Clin Neurol*. 2011 Mar;7(1):1–9. Doi: 10.3988/jcn.2011.7.1.1.
14. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke*. 2015 Jan;17(1):17–30. Doi: 10.5853/jos.2015.17.1.17.
15. Vonsattel JP, Myers RH, Hedley-Whyte ET, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol*. 1991 Nov;30(5):637–49. Doi: <https://doi.org/10.1002/ana.410300503>.
16. Greenberg SM, Vonsattel JP. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke*. 1997 Jul;28(7):1418–22. Doi: 10.1161/01.str.28.7.1418.
17. Olichney JM, Hansen LA, Hofstetter CR, Grundman M, Katzman R, Thal LJ. Cerebral Infarction in Alzheimer's Disease Is Associated With Severe Amyloid Angiopathy and Hypertension. *Archives of Neurology*. 1 de julio de 1995;52(7):702-8. Doi:10.1001/archneur.1995.00540310076019.

18. Attems J, Jellinger KA. Only cerebral capillary amyloid angiopathy correlates with Alzheimer pathology a pilot study. *Acta Neuropathologica*. 1 de febrero de 2004;107(2):83-90. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0796-9>.
19. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D et-al. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston criteria. *Neurology*. 2001;56 (4): 537-9. Doi: <https://doi.org/10.1212/WNL.56.4.537>.
20. Linn J, Halpin A, Demaerel P, Ruhland J, Giese AD, Dichgans M. et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 2010; 74: 1346–50. Doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dad605.
21. Biffi A, Anderson CD, Battey TW, Ayres AM, Greenberg SM, Viswanathan A. et al. Association between blood pressure control and risk of recurrent intracerebral hemorrhage. *JAMA* 2015; 314: 904–12. Doi: 10.1001/jama.2015.10082.
22. Eckman MH, Rosand J, Knudsen KA, Singer DE, Greenberg SM. Can patients be anticoagulated after intracerebral hemorrhage? A decision analysis. *Stroke* 2003; 34: 1710–6. Doi: <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000078311.18928.16>.
23. Weber SA, Patel RK, Lutsep HL. Cerebral amyloid angiopathy: diagnosis and potential therapies. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2018 Jun;18(6):503-13. Doi: <https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1480938>
24. Study Evaluating the Safety, Tolerability and Efficacy of PF-04360365 in Adults With Probable Cerebral Amyloid Angiopathy - Study Results - ClinicalTrials.gov.
25. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
26. World Alzheimer report 2019. <http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2019.pdf>. 2019.

27. Paula-Lima AC, Tricerri MA, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Oliveira FF, Magdesian MH, et al. Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Abeta-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Jun;41(6):1361–70. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.12.003>.
28. Barker WW, Luis CA, Kashuba A, Luis M, Harwood DG, Loewenstein D, et al. Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002 Dec;16(4):203–12. Doi: [10.1097/00002093-200210000-00001](https://doi.org/10.1097/00002093-200210000-00001).
29. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 2008;9(5): 356-369. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrg2344>.
30. Caselli RJ, Beach TG, Knopman DS, Graff-Radford NR. Alzheimer disease: scientific breakthroughs and translational challenges. *Mayo Clin Pro.* 2017;92:978-94. Doi: [10.1016/j.mayocp.2017.02.011](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.02.011).
31. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019 02;14(1):32. Doi: [10.1186/s13024-019-0333-5](https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5).
32. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 15; 1:15056. Doi: [10.1038/nrdp.2015.56](https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56).
33. Costa PTJ, Williams TF, Somerfield M. Early Identification of Alzheimer's Disease and Related Dementias. *Clinical Practice Guideline Vol.19.* Washington DC; US Dept of Health and Human Services, Agency for Health Care Policy and Research, 1996. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.1997.tb01024.x>.

34. Rascovsky K, Salmon DP, Hansen LA, Thal LJ, Galasko D. Disparate letter and semantic category fluency deficits in autopsy-confirmed frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neuropsychology*. 2007 Jan;21(1):20–30. Doi: 10.1037/0894-4105.21.1.20.
35. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The Neuropsychological Profile of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012 Apr 1;2(4):a006171–a006171. Doi: 10.1101/cshperspect.a006171.
36. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2018 Apr;14(4):535–62. Doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018
37. Anand K, Sabbagh M. Amyloid Imaging: Poised for Integration into Medical Practice. *Neurotherapeutics*. 2017 Jan;14(1):54–61. Doi: 10.1007/s13311-016-0474-y.
38. Marcus C, Mena E, Subramaniam RM. Brain PET in the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Clinical Nuclear Medicine*. 2014 Oct;39(10):e413–26. Doi: 10.1097/RLU.0000000000000547.
39. Inui Y, Ito K, Kato T. Longer-Term Investigation of the Value of 18F-FDG-PET and Magnetic Resonance Imaging for Predicting the Conversion of Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease: A Multicenter Study. *JAD*. 2017 Oct 3;60(3):877–87. Doi: 10.3233/JAD-170395.
40. Lee JC, Kim SJ, Hong S, Kim Y. Diagnosis of Alzheimer's disease utilizing amyloid and tau as fluid biomarkers. *Exp Mol Med*. 2019 May;51(5):1–10. Doi: 10.1038/s12276-019-0250-2.
41. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1:a0061889. Doi: 10.1101/cshperspect.a006189.

42. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Siani J Med.* 2010;77:32-42. Doi: <https://doi.org/10.1002/msj.20157>.
43. Kumar A, Singh A. Ekavali: a review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep.* 2015;67:195-203. Doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.004.
44. Goedert M. Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain.* 2009;132:1102:11. Doi: <https://doi.org/10.1093/brain/awn256>.
45. Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H. The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ* 2006. 2006:re1. Doi: 10.1126/sageke.2006.6.re1.
46. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:321-39. Doi: <https://doi.org/10.1097/00005072-199704000-00001>.
47. Malek-Ahmadi M, Perez Se, Chen K, Mufson EJ. Neuritic and diffuse plaque associations with memory in non-cognitively impaired elderly. *J Alzheimers Dis.* 2016;53:1641-52. Doi: 10.3233/JAD-160365.
48. Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L, Urbanc B, Hasselmo ME, Stanley HE, Hyman BT. Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5274-9. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5274>.
49. Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:4506-4510. Doi: 10.1073/pnas.85.12.4506.

50. Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:5562–5566. Doi: 10.1073/pnas.91.12.5562.
51. Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med*. 1996;2:783–787. Doi: 10.1038/nm0796-783.
52. Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett*. 1986;65:351–355. Doi: 10.1016/0304-3940(86)90288-0.
53. Perry G, Kawai M, Tabaton M, Onorato M, Mulvihill P, Richey P, Morandi A, Connolly JA, Gambetti P. Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *J Neurosci*. 1991;11:1748–1755. Doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-06-01748.1991>.
54. Mitchell TW, Nissanov J, Han LY, Mufson EJ, Schneider JA, Cochran EJ, Bennett DA, Lee VM, Trojanowski JQ, Arnold SE. Novel method to quantify neuropil threads in brains from elders with or without cognitive impairment. *J Histochem Cytochem*. 2000;48:1627–1638. Doi: 10.1177/002215540004801206.
55. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, Perl DP. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 1995;52:81–88. Doi: 10.1001/archneur.1995.00540250089017.
56. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992;42:631–639. Doi: <https://doi.org/10.1212/WNL.42.3.631>.

57. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*. 1992;13:179-89. Doi: 10.1016/0197-4580(92)90027-u.
58. Thal DR, Del Tredici K, Ludolph AC, Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Braak H, Knippschild U. Stages of granulovacuolar degeneration: their relation to Alzheimer's disease and chronic stress response. *Acta Neuropathol*. 2011;122:577–589. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0871-6>.
59. Hirano A. Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994;20:3–11. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1994.tb00951.x>
60. Gibson PH, Tomlinson BE. Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1977;33:199–206. Doi: 10.1016/0022-510x(77)90193-9.
61. Ball M, Braak H, Coleman P, Dickson D, Duyckaerts C, Gambetti P, Hansen L, Hyman B, Jellinger K, Khachaturian Z, et al. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1997;18:S1–S2. Doi: 10.1097/00005072-199710000-00002.
62. Lee G, Leugers CJ. Tau and Tauopathies. En: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Elsevier; 2012 [citado 25 de abril de 2021]. p. 263-93. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00004-7>.
63. Sergeant N, Delacourte A, Buée L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. enero de 2005;1739(2-3):179-97. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.020>.

64. Kovacs GG. Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice: Neuropathology of tauopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015 Feb;41(1):3-23. Doi:10.1111/nan.12208.
65. Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences.* 1998 Oct;21(10):428–33. Doi:10.1016/s0166-2236(98)01337-x.
66. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7(3):263-269. Doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005
67. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assesment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2012;8:1-13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.10.007>.
68. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H. Phases of a beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58:1791-800. Doi: 10.1212/wnl.58.12.1791.
69. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006; 112:389–40. Doi: 10.1007/s00401-006-0127-z.
70. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic

- assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991;41:479–486. Doi: 10.1212/wnl.41.4.479.
71. McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. April 2006. Doi: 10.1002/14651858.CD003154.pub5.
72. Nygaard HB. Current and Emerging Therapies for Alzheimer's Disease. *Clin Ther*. 2013;35(10):1480-1489. Doi: 10.1016/j.clinthera.2013.09.009 93.
73. Nakanishi M, Endo K, Hirooka K, et al. Psychosocial behaviour management programme for home-dwelling people with dementia: A cluster-randomized 168 controlled trial. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2018;33(3):495-503. Doi:10.1002/gps.4784.
74. Hara Y, McKeehan N, Fillit HM. Translating the biology of aging into novel therapeutics for Alzheimer disease. *Neurology*. 2019 Jan;92(2):84-93. Doi: 10.1212/WNL.0000000000006745.
75. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019 Oct;179(2):312–39. Doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001.
76. Corriveau RA, Bosetti F, Emr M, Gladman JT, Koenig JI, Moy CS, et al. The Science of Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia (VCID): A Framework for Advancing Research Priorities in the Cerebrovascular Biology of Cognitive Decline. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Mar;36(2):281–8. Doi: 10.1007/s10571-016-0334-7.
77. Boyle PA, Yu L, Wilson RS, Leurgans SE, Schneider JA, Bennett DA. Person-specific contribution of neuropathologies to cognitive loss in old age: Neuropathologies and Cognition. *Ann Neurol*. 2018 Jan;83(1):74–83. Doi: 10.1002/ana.25123

78. Iturria-Medina Y, Sotero RC, Toussaint PJ, Mateos-Pérez JM, Evans AC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun.* 2016 21;7:11934. Doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms11934>.
79. Fotiadis P, van Rooden S, van der Grond J, Schultz A, Martinez-Ramirez S, Auriel E, et al. Cortical atrophy in patients with cerebral amyloid angiopathy: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2016;15(8):811–9. Doi: [10.1016/S1474-4422\(16\)30030-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30030-8).
80. Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JP, Rebeck GW, Greenberg SM. Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 2001 Jun;49(6):697–705. Doi: [10.1002/ana.1009](https://doi.org/10.1002/ana.1009).
81. Goos JDC, Kester MI, Barkhof F, Klein M, Blankenstein MA, Scheltens P, et al. Patients With Alzheimer Disease With Multiple Microbleeds: Relation With Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Cognition. *Stroke.* 2009 Nov;40(11):3455–60. Doi: [10.1161/STROKEAHA.109.558197](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.558197).
82. Boyle PA, Yu L, Nag S, Leurgans S, Wilson RS, Bennett DA, et al. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology.* 2015 85:1930–6. Doi: [10.1212/WNL.0000000000002175](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002175).
83. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2015 Aug;11(8):457–70. Doi: [10.1038/nrneurol.2015.119](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119).
84. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(1):30–42. Doi: [10.1038/s41582-019-0281-2](https://doi.org/10.1038/s41582-019-0281-2).

85. Keable A, Fenna K, Yuen HM, Johnston DA, Smyth NR, Smith C, et al. Deposition of amyloid β in the walls of human leptomeningeal arteries in relation to perivascular drainage pathways in cerebral amyloid angiopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016 May;1862(5):1037–46. Doi: 10.1016/j.bbadis.2015.08.024.
86. Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, et al. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Feb 15;301(1):41–52. Doi: <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1112>.
87. Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L, Younkin LH, et al. Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem*. 1995 Mar 31;270(13):7013–6. Doi: 10.1074/jbc.270.13.7013.
88. Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, Nirasawa T, Wada-Kakuda S, Takahashi-Fujigasaki J, et al. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun*. 2017 16;5(1):73.1. Doi: 10.1186/s40478-017-0477-x.
89. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, et al. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Nov 15;90(22):10836–40. Doi: 10.1073/pnas.90.22.10836.
90. Attems J, Lintner F, Jellinger KA. Amyloid beta peptide 1-42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta Neuropathol*. 2004 Apr;107(4):283–91. Doi: 10.1007/s00401-004-0822-6.

91. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the .beta. amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1993 May 11;32(18):4693–7. Doi: 10.1021/bi00069a001.
92. McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, et al. A β 42 Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition in Mice. *Neuron*. 2005 Jul;47(2):191–9. Doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.030.
93. Revesz T, Ghiso J, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Frangione B, et al. Cerebral amyloid angiopathies: a pathologic, biochemical, and genetic view. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003 Sep;62(9):885–98. Doi: 10.1093/jnen/62.9.885.
94. Wattendorff AR, Frangione B, Luyendijk W, Bots GT. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis, Dutch type (HCHWA-D): clinicopathological studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995 Jun;58(6):699–705. Doi: <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.58.6.699>.
95. Nochlin D, Bird TD, Nemens EJ, Ball MJ, Sumi SM. Amyloid angiopathy in a Volga German family with Alzheimer's disease and a presenilin-2 mutation (N141I). *Ann Neurol* 1998;43:131–135. Doi: 10.1002/ana.410430124.
96. Dermaut B, Kumar-Singh S, De Jonghe C, Cruts M, Löfgren A, Lübke U, et al. Cerebral amyloid angiopathy is a pathogenic lesion in Alzheimer's disease due to a novel presenilin 1 mutation. *Brain*. 2001 Dec;124(Pt 12):2383–92. Doi: <https://doi.org/10.1093/brain/124.12.2383>.
97. Sánchez-Valle R, Lladó A, Ezquerra M, Rey MJ, Rami L, Molinuevo JL. A novel mutation in the PSEN1 gene (L286P) associated with familial early-onset dementia of Alzheimer type and lobar haematomas. *Eur J Neurol*. 2007 Dec;14(12):1409–12. Doi: 10.1111/j.1468-1331.2007.01988.x.

98. Mann DM, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T, Members of the Familial Alzheimer's Disease Pathology Study Group. Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2001 Jun;158(6):2165–75. 10.1016/s0002-9440(10)64688-3.
99. Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques: An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol.* 1982;57(2–3):239–42. Doi: 10.1007/BF00685397.
100. Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S, et al. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1988 Dec;133(3):456–63.
101. Kalaria RN, Grahovac I. Serum amyloid P immunoreactivity in hippocampal tangles, plaques and vessels: implications for leakage across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Brain Research.* 1990 May;516(2):349–53. Doi: 10.1016/0006-8993(90)90941-4.
102. Rozemuller JM, Abbink JJ, Kamp AM, Stam FC, Hack CE, Eikelenboom P. Distribution pattern and functional state of α 1-antichymotrypsin in plaques and vascular amyloid in Alzheimer's disease: An immunohistochemical study with monoclonal antibodies against native and inactivated α 1-antichymotrypsin. *Acta Neuropathol.* 1991 Aug;82(3):200–7. Doi: 10.1007/BF00294446.
103. Van Gool D, de Strooper B, Van Leuven F, Triau E, Dom R. α 2-macroglobulin expression in neuritic-type plaques in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 1993 May;14(3):233–7. Doi: 10.1016/0197-4580(93)90006-w.

104. Verbeek MM, Otte-Höller I, Westphal JR, Wesseling P, Ruiters DJ, de Waal RM. Accumulation of intercellular adhesion molecule-1 in senile plaques in brain tissue of patients with Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1994 Jan;144(1):104–16.
105. McGeer PL, Klegeris A, Walker DG, Yasuhara O, McGeer EG. Pathological Proteins in Senile Plaques. *Tohoku J Exp Med.* 1994;174(3):269–77. Doi: 10.1620/tjem.174.269.
106. Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ. Brain Expression of Apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry.* 2002 Nov 23;66(6):2429–35. Doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66062429.x.
107. Verbeek MM, Otte-Höller I, Veerhuis R, Ruiters DJ, De Waal RMW. Distribution of A β -associated proteins in cerebrovascular amyloid of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica.* 1998 Dec 3;96(6):628–36. Doi: 10.1007/s004010050944.
108. Hashimoto T. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *The EMBO Journal.* 2002 Apr 1;21(7):1524–34. Doi: 10.1093/emboj/21.7.1524.
109. Kowa H, Sakakura T, Matsuura Y, Wakabayashi T, Mann DMA, Duff K, et al. Mostly Separate Distributions of CLAC- versus A β 40- or Thioflavin S-Reactivities in Senile Plaques Reveal Two Distinct Subpopulations of β -Amyloid Deposits. *The American Journal of Pathology.* 2004 Jul;165(1):273–81. Doi: 10.1016/s0002-9440(10)63295-6.
110. Zabel M, Schrag M, Crofton A, Tung S, Beaufond P, Van Ornam J, et al. A Shift in Microglial β -Amyloid Binding in Alzheimer's Disease Is Associated with Cerebral Amyloid Angiopathy: Microglial A β Binding in CAA. *Brain Pathology.* 2013 Jul;23(4):390–401. Doi: 10.1111/bpa.12005.

111. Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, et al. The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid β is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochemical Journal*. 1993 Jul 1;293(1):27–30. Doi: 10.1042/bj2930027.
112. Webster S, O'Barr S, Rogers J. Enhanced aggregation and beta structure of amyloid beta peptide after coincubation with C1Q. *J Neurosci Res*. 1994 Nov 1;39(4):448–56. Doi: 10.1002/jnr.490390412.
113. Snow AD, Sekiguchi R, Nochlin D, Fraser P, Kimata K, Mizutani A, et al. An important role of heparan sulfate proteoglycan (perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar $\alpha\beta$ -amyloid in rat brain. *Neuron*. 1994 Jan;12(1):219–34. Doi: 10.1016/0896-6273(94)90165-1.
114. Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature*. 1994 Nov;372(6501):92–4. Doi: 10.1038/372092a0.
115. Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, Arishima H, Kikuta K, Yamashita T, et al. Apolipoprotein E and clusterin inhibit the early phase of amyloid- β aggregation in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *acta neuropathol commun*. 2019 Dec;7(1):12. Doi: 10.1186/s40478-019-0662-1.
116. Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B. Conformational mimicry in Alzheimer's disease. Role of apolipoproteins in amyloidogenesis. *Am J Pathol*. 1995 Aug;147(2):238–44.
117. Cho HS, Hyman BT, Greenberg SM, Rebeck GW. Quantitation of apoE domains in Alzheimer disease brain suggests a role for apoE in A β aggregation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Apr;60(4):342–9. Doi: <https://doi.org/10.1093/jnen/60.4.342>.

118. Thal DR, Papassotiropoulos A, Saido TC, Griffin WST, Mrak RE, Kölsch H, et al. Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE epsilon4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2010 Aug;120(2):169–83. Doi: 10.1007/s00401-010-0707-9
119. Olichney JM, Hansen LA, Galasko D, Saitoh T, Hofstetter CR, Katzman R, et al. The apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with increased neuritic plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and Lewy body variant. *Neurology.* 1996 Jul;47(1):190–6. Doi: 10.1097/00019442-199700510-00012.
120. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):180–4. Doi: <https://doi.org/10.1038/ng0694-180>.
121. Greenberg, S. M., Rebeck, G. W., Vonsattel, J. P. V., Gomez-Isla, T. & Hyman, B. T. Apolipoprotein E e4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* 38, 254–259 (1995). Doi: 10.1002/ana.410380219.
122. Liu, Y. et al. APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 127–134 (2015). Doi: 10.1136/jnnp-2014-307719.
123. Strittmatter, W. J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 1977–1981 (1993). Doi: 10.1073/pnas.90.5.1977.
124. Matsubara E, Frangione B, Ghiso J. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7563–7. Doi: 10.1074/jbc.270.13.7563.
125. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L-S, Vardarajan BN, Buross J, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated

- with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011 May;43(5):436–41. Doi: 10.1038/ng.801.
126. Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke.* (2004) 35(Suppl.1):2616–9. Doi: 10.1161/01.STR.0000143224.36527.44.
127. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron.* 2009 Aug;63(3):287–303. Doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.026.
128. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, et al. ApoE influences amyloid- (A) clearance despite minimal apoE/A association in physiological conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013 May 7;110(19):E1807–16. Doi: 10.1073/pnas.1220484110.
129. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nat Genet.* 1997 Nov;17(3):263–4. Doi: 10.1038/ng1197-263.
130. Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, et al. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid- β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 1999 Mar 15;103(6):R15–21. Doi: 10.1172/JCI6179.
131. Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 1997 41:716–21. Doi: 10.1002/ana.410410607.
132. Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Shoamanesh A, Oliveira-Filho J, Frosch M, Vashkevich A, et al. Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: evidence for different disease phenotypes. *Neurology.* 2015 84:1206–12. Doi: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001398>.

133. McGeer PL, Kawamata T, Walker DG. Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* 1992 579:337–41. Doi: 10.1016/0006-8993(92)90071-g.
134. Manousopoulou A, Gatherer M, Smith C, Nicoll JAR, Woelk CH, Johnson M, et al. Systems proteomic analysis reveals that clusterin and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 increase in leptomenigeal arteries affected by cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017 43:492–504. Doi: 10.1111/nan.12342.
135. Tan L, Wang HF, Tan MS, Tan CC, Zhu XC, Miao D, et al. . Effect of CLU genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging markers in healthy, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease cohorts. *Sci Rep.* (2016) 6:26027. Doi: 10.1038/srep26027.
136. Schrijvers EMC, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 2011 305:1322–6. Doi: 10.1001/jama.2011.381.
137. de Retana SF, Marazuela P, Solé M, Colell G, Bonaterra A, Sánchez-Quesada JL, et al. Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin modulates brain beta-amyloid levels in APP23 mice. *Alz Res Therapy.* 2019 Dec;11(1):42. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0498-8>.
138. Roussotte FF, Gutman BA, Madsen SK, Colby JB, Thompson PM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Combined effects of Alzheimer risk variants in the CLU and ApoE genes on ventricular expansion patterns in the elderly. *J Neurosci.* 2014;34(19):6537-6545. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.5236-13.2014 227.
139. Ling I-F, Bhongsatiern J, Simpson JF, Fardo DW, Estus S. Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS One.* 2012;7(4):e33923. Doi: 10.1371/journal.pone.0033923.

140. Wojtas AM, Kang SS, Olley BM, Gatherer M, Shinohara M, Lozano PA, et al. Loss of clusterin shifts amyloid deposition to the cerebrovasculature via disruption of perivascular drainage pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017 114: E6962–71. Doi: 10.1073/pnas.1701137114.
141. Qi XM, Wang C, Chu XK, Li G, Ma JF. Intraventricular infusion of clusterin ameliorated cognition and pathology in Tg(6799). *BMC Neurosci*. 2018 19:2. Doi: 10.1186/s12868-018-0402-7.
142. Balazs Z, Panzenboeck U, Hammer A, Sovic A, Quehenberger O, Malle E, et al. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by *in vitro* blood-brain barrier model. *J Neurochem*. 2004 89:939–50. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02373.x,
143. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*. 2001 12:105–12. Doi: 10.1097/00041433-200104000-00003.
144. Vollbach H, Heun R, Morris CM, Edwardson JA, McKeith IG, Jessen F, et al. APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann Neurol*. 2005 Sep;58(3):436–41. Doi: 10.1002/ana.20593.
145. Helbecque N, Codron V, Cottel D, Amouyel P. An *Apolipoprotein A-I* Gene Promoter Polymorphism Associated with Cognitive Decline, but Not with Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008;25(2):97–102. Doi: 10.1159/000112176.
146. 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*. 21(1):27-30. Doi:10.1016/S0197-4580(99)00103-7

147. Kitamura Y, Usami R, Ichihara S, et al. Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 2017;39(3):231-238. Doi:10.1080/01616412.2017.1281195
148. Raygani AV, Rahimi Z, Kharazi H, Tavilani H, Pourmotabbed T. Association between apolipoprotein E polymorphism and serum lipid and apolipoprotein levels with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2006;408(1):68-72. Doi: 10.1016/j.neulet.2006.08.048
149. Slot RER, Van Harten AC, Kester MI, et al. Apolipoprotein A1 in Cerebrospinal Fluid and Plasma and Progression to Alzheimer's Disease in Non-Demented Elderly. *J Alzheimers Dis.* 2017;56(2):687-697. Doi:10.3233/JAD-151068
150. Montañola A, de Retana SF, López-Rueda A, et al. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med.* 2016;18(1):99-108. Doi:10.1007/s12017-015-8381-7.
151. Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterova MI, Lazo JS. Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry.* 2001 Mar 27;40(12):3553–60. Doi: 10.1021/bi002186k.
152. Merino-Zamorano C, Fernández-de Retana S, Montañola A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, Gosselet F, Montaner J, Hernández-Guillamon M. Modulation of Amyloid- β 1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *J Alzheimers Dis.* 2016 May 25;53(2)-91. Doi: 10.3233/JAD-150976.
153. Handattu SP, Garber DW, Monroe CE, van Groen T, Kadish I, Nayyar G, et al. Oral apolipoprotein A-I mimetic peptide improves cognitive function and reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease.* 2009 Jun;34(3):525–34. Doi: 10.1016/j.nbd.2009.03.007.

154. Letterov I, Fitz NF, Cronican AA, Fogg A, Letterov P, Kodali R, et al. Apolipoprotein A-I Deficiency Increases Cerebral Amyloid Angiopathy and Cognitive Deficits in APP/PS1 Δ E9 Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Nov;285(47):36945–57. Doi: 10.1074/jbc.M110.127738.
155. Lewis TL, Cao D, Lu H, et al. Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2010;285(47):36958-36968. Doi:10.1074/jbc.M110.127829.
156. Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, et al. Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*. 2014 Jan;505(7484):550-4. Doi:10.1038/nature12825.
157. Gigante M, Pontrelli P, Montemurno E, Roca L, Aucella F, Penza R, et al. CD2AP mutations are associated with sporadic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009 june;24(6):1858-64. Doi:10.1093/ndt/gfn712.
158. Kunkle BW, Grenier-Boley B, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet*. 2019 Mar;51(3):414-30. Doi:10.1038/s41588-019-0358-2.
159. Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2013 Dec;45(12):1452-8. Doi:10.1038/ng.2802.
160. Van Acker ZP, Bretou M, Annaert W. Endo-lysosomal dysregulations and late-onset Alzheimer's disease: impact of genetic risk factors. *Mol Neurodegener*. 2019 03;14(1):20. Doi:10.1186/s13024-019-0323-7.
161. Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, et al. A Novel Adaptor Protein Orchestrates Receptor Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts. *Cell*. 1998 Sep;94(5):667-77. Doi:10.1016/S0092-8674(00)81608-6.

162. Shih N. Congenital Nephrotic Syndrome in Mice Lacking CD2-Associated Protein. *Science*. 8 de octubre de 1999;286(5438):312-5. Doi:10.1126/science.286.5438.312.
163. Cummins TD, Wu KZL, Bozatzki P, Dingwell KS, Macartney TJ, Wood NT, et al. PAWS1 controls cytoskeletal dynamics and cell migration through association with the SH3 adaptor CD2AP. *J Cell Sci*. 2018 Jan;131(1):jcs202390. Doi: 10.1242/jcs.202390.
164. Shih N-Y, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP Localizes to the Slit Diaphragm and Binds to Nephrin via a Novel C-Terminal Domain. *The American Journal of Pathology*. 2001 Dec;159(6):2303–8. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)63080-5.
165. Feng DN, Yang YH, Wang DJ, Meng DC, Fu R, Wang JJ, et al. Mutational analysis of podocyte genes in children with sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):9514-22. Doi: 10.4238/2014.November.11.16.
166. Löwik M, Levtchenko E, Westra D, Groenen P, Steenbergen E, Weening J, et al. Bigenic heterozygosity and the development of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Oct;23(10):3146–51. Doi: 10.1093/ndt/gfn208.
167. Tsvetkov D, Hohmann M, Anistan YM, Mannaa M, Harteneck C, Rudolph B, et al. A *CD2AP* Mutation Associated with Focal Segmental Glomerulosclerosis in Young Adulthood. *Clin Med Insights Case Rep*. 2016 Jan;9:CCRep.S30867. Doi: 10.4137/CCRep.S30867.
168. Lehtonen S, Tienari J, Londesborough A, Pirvola U, Ora A, Reima I, et al. CD2-associated protein is widely expressed and differentially regulated during embryonic development. *Differentiation*. 2008 Jun;76(5):506-17. Doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00255.x.

169. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000 Oct;279(4):F785-92. Doi:10.1152/ajprenal.2000.279.4.F785.
170. Harrison BJ, Venkat G, Lamb JL, Hutson TH, Drury C, Rau KK, et al. The Adaptor Protein CD2AP Is a Coordinator of Neurotrophin Signaling-Mediated Axon Arbor Plasticity. *J Neurosci*. 2016 Apr;36(15):4259-75. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.2423-15.2016.
171. Chen H, Wu G, Jiang Y, Feng R, Liao M, Zhang L, et al. Analyzing 54,936 Samples Supports the Association Between CD2AP rs9349407 Polymorphism and Alzheimer's Disease Susceptibility. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):1-7. Doi:10.1007/s12035-014-8834-2.
172. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*. 2015 Jan;77(1):43-51. Doi:10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
173. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013 Dec;19(12):1584–96. Doi:10.1038/nm.3407.
174. Yan Y, Zhao A, Qui Y, Li Y, Yan R, Wang Y, et al. Genetic Association of FERMT2, HLA-DRB1, CD2AP, and PTK2B Polymorphisms With Alzheimer's Disease Risk in the Southern Chinese Population. *Front Aging Neurosci*. 2020 Feb 4;12:16. Doi:10.3389/fnagi.2020.00016.
175. Tan M-S, Yang Y-X, Xu W, Wang H-F, Tan L, et al. Associations of Alzheimer's disease risk variants with gene expression, amyloidosis, tauopathy, and neurodegeneration. *Alz Res Therapy*. 2021 Dec;13(1):15. Doi:10.1186/s13195-020-00755-7.

176. Hollingworth P, Harold D, Sims R, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011 May;43(5):429-35. Doi:10.1038/ng.803.
177. Shulman JM, Chen K, Keenan BT, Chibnik LB, Fleisher A, Thiyyagura P, et al. Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. *JAMA Neurol.* 2013 Sep 1;70(9):1150–7. Doi:10.1001/jamaneurol.2013.2815.
178. Beecham GW, Hamilton K, Naj AC, Martin ER, Huentelman M, Myers AJ, et al. Genome-Wide Association Meta-analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias. Gibson G, editor. *PLoS Genet.* 2014 Sep;10(9):e1004606. Doi:10.1371/journal.pgen.1004606.
179. Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Shiung MM, Weigand SD, Knopman DS, et al. β -amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol.* 2008 Feb;63(2):204-12. Doi:10.1002/ana.21223.
180. Liao F, Jiang H, Srivatsan S, Xiao Q, Lefton KB, Yamada K, et al. Effects of CD2-associated protein deficiency on amyloid- β in neuroblastoma cells and in an APP transgenic mouse model. *Mol Neurodegeneration.* 2015 Dec;10(1):12. Doi:10.1186/s13024-015-0006-y.
181. Ubelmann F, Burrenha T, Salavessa L, Gomes R, Ferreira C, Moreno N, et al. Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. *EMBO Rep.* 2017;18(1):102–22. Doi:10.15252/embr.201642738.
182. Furusawa K, Takasugi T, Chiu Y-W, Hori Y, Tomita T, Fukuda M, et al. CD2-associated protein (CD2AP) overexpression accelerates amyloid precursor protein (APP) transfer from early endosomes to the lysosomal degradation pathway. *Journal of Biological Chemistry.* 2019 Jul;294(28):10886-99. Doi: 10.1074/jbc.RA118.005385.
183. Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D, et al. Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility

- genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet.* 2014 Feb 15;23(4):870–7. Doi:10.1093/hmg/ddt478.
184. Ojelade SA, Lee TV, Giagtzoglou N, Yu L, Ugur B, Li Y, et al. cindr, the *Drosophila* Homolog of the CD2AP Alzheimer's Disease Risk Gene, Is Required for Synaptic Transmission and Proteostasis. *Cell Rep.* 2019 Aug 13;28(7):1799-1813.e5. Doi:10.1016/j.celrep.2019.07.041.
185. Carare RO, Hawkes CA, Jeffrey M, Kalaria RN, Weller RO. Review: cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 39:593–611. Doi: 10.1111/nan.12042
186. Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Governale S, Miguel C, Miao W, et al. 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.* 1997 Nov;69(5):1995–2004. Doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69051995.x
187. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, et al. 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 May;27(5):909-18. Doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600419.
188. Tai LM, Thomas R, Marottoli FM, Koster KP, Kanekiyo T, Morris AWJ, et al. The role of APOE in cerebrovascular dysfunction. *Acta Neuropathol.* 2016 May;131(5):709–23. Doi: 10.1007/s00401-016-1547-z.
189. 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 541:163–6. Doi: 10.1016/0006-8993(91)91092-f.

190. Trembath D, Ervin JF, Broom L, Szymanski M, Welsh-Bohmer K, Pieper C, et al. . The distribution of cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease varies with ApoE genotype. *Acta Neuropathol.* 2007 113:23–31. Doi: 10.1007/s00401-006-0162-9.
191. Love S, Chalmers K, Ince P, Esiri M, Attems J, Jellinger K, et al. . Development, appraisal, validation and implementation of a consensus protocol for the assessment of cerebral amyloid angiopathy in post-mortem brain tissue. *Am J Neurodegener Dis.* 2014 3:19–32.
192. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, Kokoris GJ, Takis C, Kanter DS, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke.* 1996 Aug;27(8):1333–7. Doi: 10.1161/01.STR.27.8.1333.
193. Woo D, Falcone GJ, Devan WJ, Brown WM, Biffi A, Howard TD, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 1q22 as a susceptibility locus for intracerebral hemorrhage. *Am J Hum Genet.* 2014 Apr 3;94(4):511–21. Doi: 10.1161/01.str.0000014774.88027.22
194. Teng Z, Guo Z, Zhong J, Cheng C, Huang Z, Wu Y, et al. . ApoE influences the blood-brain barrier through the NF- κ B/MMP-9 pathway after traumatic brain injury. *Sci Rep.* 2017 7:6649. Doi: 10.1038/s41598-017-06932-3.
195. Pang J, Chen Y, Kuai L, Yang P, Peng J, Wu Y, et al. . Inhibition of blood-brain barrier disruption by an apolipoprotein E-mimetic peptide ameliorates early brain injury in experimental subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 2017 8:257–72. Doi: 10.1007/s12975-016-0507-1.
196. de Retana SF, Marazuela P, Solé M, Colell G, Bonaterra A, Sánchez-Quesada JL, et al. Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin modulates

- brain beta-amyloid levels in APP23 mice. *Alzheimers Res Ther.* 2019 May 10;11(1):42. Doi: 10.1186/s13195-019-0498-8
197. Möckel B, Zinke H, Flach R, Weiss B, Weiler-Güttler H, Gassen HG. Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium *in vitro*. *J Neurochem.* 1994 62:788–98. Doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62020788.x
198. Mäkelä M, Paetau A, Polvikoski T, Myllykangas L, Tanskanen M. Capillary amyloid- β protein deposition in a population-based study (Vantaa 85+). *J Alzheimers Dis.* 2016 43:492–504. Doi: 10.3233/JAD-150241.
199. Matsuo K, Shindo A, Niwa A, Tabei KI, Akatsu H, Hashizume Y, et al. . Complement activation in capillary cerebral amyloid angiopathy. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2017 44:343–53. Doi: 10.1159/000486091.
200. Cochran JN, Rush T, Buckingham SC, Roberson ED. The Alzheimer’s disease risk factor CD2AP maintains blood-brain barrier integrity. *Hum Mol Genet.* 2015 Dec 1;24(23):6667–74. Doi: 10.1093/hmg/ddv371.
201. Chibnik LB, White CC, Mukherjee S, Raj T, Yu L, Larson EB, et al. Susceptibility to neurofibrillary tangles: role of the PTPRD locus and limited pleiotropy with other neuropathologies. *Mol Psychiatry.* 2018 Jun;23(6):1521-9. Doi:10.1038/mp.2017.20.
202. Guerreiro R, Wotjas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, et al. TREM2 variants in Alzheimer disease. *N Engl J Med.* 2013;368:117-27. Doi:10.1056/NEJMoa1211851.
203. Tao Q-Q, Liu Z-J, Sun Y-M, Li H-L, Yang P, Liu D-S, et al. Decreased gene expression of CD2AP in Chinese patients with sporadic Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging.* 2017 Aug;56:212.e5-212.e10. Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.013.

204. Ando K, Brion J-P, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R, et al. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol.* 2013 Jun;125(6):861-78. Doi: 10.1007/s00401-013-1111-z.
205. Ando K, Tomimura K, Sazdovitch V, Suain V, Yilmaz Z, Authelet M, et al. Level of PICALM, a key component of clathrin-mediated endocytosis, is correlated with levels of phosphotau and autophagy-related proteins and is associated with tau inclusions in AD, PSP and Pick disease. *Neurobiol Dis.* 2016 Oct;94:32-43. Doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.017.
206. Ando K, De Decker R, Vergara C, Yilmaz Z, Mansour S, Suain V, et al. Picalm reduction exacerbates tau pathology in a murine tauopathy model. *Acta Neuropathol.* 2020 Apr;139(4):773-89. Doi: 10.1007/s00401-020-02125-x.
207. Jiang S, Bhaskar K. Degradation and Transmission of Tau by Autophagic-Endolysosomal Networks and Potential Therapeutic Targets for Tauopathy. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:586731. DOI: 10.3389/fnmol.2020.586731.
208. Ortega Roldan JL, Casares S, Ringkjøbing Jensen M, Cárdenes N, Bravo J, Blackledge M, et al. Distinct Ubiquitin Binding Modes Exhibited by SH3 Domains: Molecular Determinants and Functional Implications. Buday L, editor. *PLoS ONE.* 11 de septiembre de 2013;8(9):e73018. Doi: 10.1371/journal.pone.0073018.
209. Arakhamia T, Lee CE, Carlomagno Y, Duong DM, Kundinger SR, Wang K, et al. Posttranslational Modifications Mediate the Structural Diversity of Tauopathy Strains. *Cell.* 2020 Feb;180(4):633-644.e12. Doi: <https://doi.org/10.016/j.cell.2020.01.027>.
210. Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buée L, Hof PR, Watzet A, et al. Specific Pathological Tau Protein Variants Characterize Pick's Disease: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 1996 Feb;55(2):159-68. Doi: <https://doi.org/10.1097/00005072-199602000-00004>.

211. Arima K. Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: Immunoelectron microscopic demonstration of tau filaments in tauopathies. *Neuropathology*. 2006 Oct;26(5):475-83. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2006.00669.x>
212. Uchihara T. Pretangles and neurofibrillary changes: Similarities and differences between AD and CBD based on molecular and morphological evolution: Pretangles and tangles. *Neuropathology*. 2014 Dec;34(6):571-7. Doi: <https://doi.org/10.1111/neup.12108>.
213. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993 Oct 15;90(20):9649–53. Doi: 10.1073/pnas.90.20.9649.
214. Tiraboschi P, Hansen LA, Masliah E, Alford M, Thal LJ, Corey-Bloom J. Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004 Jun 8;62(11):1977–83. Doi: 10.1212/01.wnl.0000128091.92139.0f.
215. Therriault J, Benedet AL, Pascoal TA, Mathotaarachchi S, Chamoun M, Savard M, et al. Association of Apolipoprotein E ϵ 4 With Medial Temporal Tau Independent of Amyloid- β . *JAMA Neurol*. 2020 Apr 1;77(4):470. Doi: 10.1001/jamaneurol.2019.4421.
216. Zhao, N., Liu, CC., Van Ingelgom, A.J. *et al.* APOE ϵ 2 is associated with increased tau pathology in primary tauopathy. *Nat Commun* 9, 4388 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06783-0>.
217. Sugimoto K, Miyazawa T, Enya T, Miyazaki K, Okada M, Takemura T. Cyclosporine A induced histological changes of Cathepsin L and CD2AP expression

- in renal glomeruli and tubules. *Clin Exp Nephrol*. 2017 Feb;21(1):83–91. Doi: 10.1007/s10157-016-1257-9.
218. Tsvetkov D, Hohmann M, Anistan YM, Mannaa M, Harteneck C, Rudolph B, et al. A *CD2AP* Mutation Associated with Focal Segmental Glomerulosclerosis in Young Adulthood. *Clin Med Insights Case Rep*. 2016 Jan;9:CCRep.S30867. Doi: 10.4137/CCRep.S30867.
219. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr;14(4):535–62. Doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
220. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement*. 2011 May;7(3):263–9. Doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.

ANEXOS

1. Artículo 1

Brain ApoA-I, ApoJ and ApoE Immunodetection in Cerebral Amyloid Angiopathy

J. Camacho, T. Moliné, A. Bonaterra-Pastra, S. Ramón y Cajal, E. Martínez- Sáez y M. Hernández-Guillamon

Frontiers in neurology, 13 de marzo de 2019.



Brain ApoA-I, ApoJ and ApoE Immunodetection in Cerebral Amyloid Angiopathy

Jessica Camacho¹, Teresa Moliné¹, Anna Bonaterra-Pastra², Santiago Ramón y Cajal¹, Elena Martínez-Sáez^{1*} and Mar Hernández-Guillamon^{2*}

¹ Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain,

² Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Aurel Popa-Wagner,
University Hospital Essen, Germany

Reviewed by:

Paul O'Callaghan,
Uppsala University, Sweden
Bo Zhou,
Stanford University, United States

*Correspondence:

Elena Martínez-Sáez
eamartinez@vhebron.net
Mar Hernández-Guillamon
Mar.hernandez.guillamon@vhir.org;
marguillamon@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neurodegeneration,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 06 September 2018

Accepted: 14 February 2019

Published: 13 March 2019

Citation:

Camacho J, Moliné T,
Bonaterra-Pastra A, Ramón y Cajal S,
Martínez-Sáez E and
Hernández-Guillamon M (2019) Brain
ApoA-I, ApoJ and ApoE
Immunodetection in Cerebral Amyloid
Angiopathy. *Front. Neurol.* 10:187.
doi: 10.3389/fneur.2019.00187

Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is a common cause of lobar intracerebral hemorrhage (ICH) in elderly individuals and it is the result of the cerebrovascular deposition of beta-amyloid (A β) protein. CAA is frequently found in patients with Alzheimer's disease (AD), although it has an independent contribution to the cognitive deterioration associated with age. Specific apolipoproteins (Apo) have been associated with A β fibrillization and clearance from the brain. In this regard, in the present study, we analyzed the brain levels of ApoE, ApoA-I, and ApoJ/clusterin in autopsy brains from 20 post-mortem cases with CAA type I, CAA type II, with parenchymal A β deposits or without A β deposits. Our objective was to find a possible differential pattern of apolipoproteins distribution in the brain depending on the CAA pathological presentation. The protein expression levels were adjusted by the APOE genotype of the patients included in the study. We found that ApoE and ApoJ were abundantly present in meningeal, cortical, and capillary vessels of the brains with vascular A β accumulation. ApoE and ApoJ also deposited extracellularly in the parenchyma, especially in cases presenting A β diffuse and neuritic parenchymal deposits. In contrast, ApoA-I staining was only relevant in capillary walls in CAA type I cases. On the other hand, ICH was the principal cause of death among CAA patients in our cohort. We found that CAA patients with ICH more commonly had APOE ϵ 2 compared with CAA patients without ICH. In addition, patients who suffered an ICH presented higher vascular ApoE levels in brain. However, higher ApoE presence in cortical arteries was the only independent predictor of suffering an ICH in our cohort after adjusting by age and APOE genotype. In conclusion, while ApoE and ApoJ appear to be involved in both vascular and parenchymal A β pathology, ApoA-I seems to be mainly associated with CAA, especially in CAA type I pathology. We consider that our study helps to molecularly characterize the distribution subtypes of A β deposition within the brain.

Keywords: ApoE, ApoA-I, ApoJ, clusterin, β -amyloid, cerebral amyloid angiopathy, intracerebral hemorrhage

INTRODUCTION

Cerebral beta-amyloidosis is defined as the anomalous deposition of β -amyloid ($A\beta$) protein in the brain. $A\beta$ originates by the sequential processing of the amyloid precursor protein (APP), primarily generating peptides of 40 and 42 amino acids. The abnormal folding of amyloid material produces a β -pleated sheet secondary structure, which forms highly insoluble amyloid fibrils. In the most common form of Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA), insoluble $A\beta$ accumulates in the wall of the cortical and meningeal vessels, replacing the smooth muscle cells, and inducing vascular degeneration. However, $A\beta$ can also accumulate in brain capillaries. In this regard, CAA can be neuropathologically classified as CAA type I, which is characterized by $A\beta$ deposition in cerebral capillaries, or CAA type II, where cerebral capillaries are not involved (1). The most relevant clinical consequence of CAA is the risk of lobar symptomatic intracerebral hemorrhages (ICH) and microscopic cortical infarcts (2). CAA patients also present cognitive impairment, lower perceptual speed and episodic memory impairment, separately from the effect of Alzheimer's disease (AD) pathology (3). Indeed, AD is the most frequent neurodegenerative disease, morphologically characterized by the presence of hyperphosphorylated tau protein in the cytoplasm of neurons and extracellular $A\beta$ deposits forming parenchymal plaques. Although CAA is observed in more than 90% of AD patients (4), only a minority of AD subjects demonstrate hemorrhages suggestive of advanced CAA (5). In fact, the combination of factors that determine whether $A\beta$ accumulation occurs in parenchyma, developing into AD, or exclusively in blood brain vessels, triggering CAA-associated ICHs, still needs to be elucidated. It is plausible that the transport routes of $A\beta$ will be crucial in this process. Evidence for that is the presence of vascular amyloid and the occurrence of cerebral microhemorrhages and vasogenic edema when parenchymal $A\beta$ is mobilized by active or passive immunization in AD (6).

Specific apolipoproteins, beyond their natural role in cholesterol metabolism, have been proposed to be involved in $A\beta$ transport and clearance from the brain (7, 8). Apolipoproteins represent the protein part of lipoproteins, which classically transport cholesterol from tissues to the liver. However, their presence and function in the brain are not well-described. The main apolipoproteins present in brain are apolipoprotein E (ApoE) and apolipoprotein J (ApoJ), both of them genetically associated with cerebral β -amyloidosis. On one hand, ApoE has a determining role in the progression of $A\beta$ deposition, since having the APOE ϵ 4 allele is the major risk factor for AD (9), as well as for CAA (10). The role of ApoJ [also known as clusterin, (CLU)] in $A\beta$ pathology is highlighted by genome-wide association studies (GWAS) that found a statistical association between a single nucleotide polymorphism within the CLU gene and the risk of suffering AD (11). In addition, more recently, the association between the CLU genotype and $A\beta$ deposition, determined by PET imaging, has been described (12). Indeed, both ApoE and ApoJ have been shown to influence the amyloid fibrillogenesis process and clearance in experimental models (13–15). In this regard, apolipoprotein A-I (ApoA-I) has also

emerged as a natural chaperone able to bind $A\beta$ and prevent its aggregation and toxicity *in vitro* (16–18).

With this background, the aim of the present study was to immunohistochemically investigate the presence of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in brains classified as CAA type I, CAA type II, brains with $A\beta$ parenchymal deposits without vascular deposits and controls. Our hypothesis was that the expression and distribution of this family of apolipoproteins in the brain was modulated by the accumulation of $A\beta$ as insoluble plaques, deposits in cortical/meningeal vessels or capillaries. Furthermore, we examined whether the immunopositivity of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in brain vessels was associated with vascular $A\beta$ deposition and symptomatic ICH appearance in patients affected by CAA.

MATERIALS AND METHODS

Selection of Patients

Twenty patients with a postmortem neuropathological study performed at the Pathology Department of Vall d'Hebron University Hospital were selected for the study. A written and informed consent was obtained from all patients (presenting $A\beta$ brain deposits), or their representatives, to participate in this research protocol before the tissue donation. For control cases, we received the exemption of the Ethic Committee to analyze them as anonymized samples in the context of this study. The project was approved by the Clinical Investigation Ethical Committee of the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain PR(IR)93/2013). Patients' characteristics and causes of death are presented in **Table 1**. All samples were obtained from 2 to 20 h after decease and post-mortem specimens were fixed in 10% buffered formalin for 3–4 weeks. Macroscopic examination was then performed, and 27 cortical and subcortical areas, including midbrain, and cerebellum, were selected for routine neuropathological diagnosis. Paraffin-embedded blocks were cut into 4 μ m sections and stained with hematoxylin & eosin. $A\beta$ immunohistochemistry was performed in selected areas (as described at the end of this section). All cases were reviewed by two neuropathologists at a multiheaded microscope. Patients were divided into four groups according to $A\beta$ localization in the brain (**Figure 1**): CAA type I patients (group 1: 6/20 cases); CAA type II patients (group 2: 8/20 cases); patients with parenchymal $A\beta$ deposits without vascular involvement (group 3: 3/20 cases) and control cases with neither vascular nor parenchymal $A\beta$ deposits (group 4: 3/20 control cases).

CAA lesions were graded following the criteria described by Vonsattel et al. (19) and modified by Greenberg and Vonsattel (20). Grade 0 CAA was given when no amyloid could be found in the vessel wall. Grade 1 CAA lesions showed amyloid deposits in otherwise normal vessels. The thickening of the vessel wall with a stiff appearance defined a grade 2 CAA lesion, where the media was replaced by amyloid. Grade 3 CAA showed cracking of the vessel wall, creating a "vessel-within-vessel" appearance affecting at least 50% of the circumference of the vessel. In grade 4 CAA lesions, scarring of the wall was observed, with fibrinoid necrosis and traces of intermingled amyloid deposits. Classification into

TABLE 1 | Cause of death and patients' characteristics.

Case	Group	Age	Sex	APOE Genotype	Braak	Cerad	CAA type	Vonsattel	Cause of death
1	1	85–90	F	E4/E3	V–VI	C	I	II	Intracerebral hemorrhage
2	1	75–80	F	E3/E3	IV	C	I	III	Intracerebral hemorrhage
3	1	75–80	F	E3/E3	I	A	I	II	Metastatic colon adenocarcinoma
4	1	70–75	M	E4/E3	II	B	I	II	Intracerebral hemorrhage
5	1	80–85	M	E4/E2	–	–	I	II	Intracerebral hemorrhage
6	1	75–80	M	E4/E3	III	C	I	II	Heart failure
7	2	80–85	M	E2/E3	IV	B	II	II	Intracerebral hemorrhage
8	2	85–90	F	E2/E3	V–VI	C	II	IV	Intracerebral hemorrhage
9	2	65–70	M	E3/E3	II	C	II	II	Pericarditis
10	2	90–95	F	E3/E3	III	C	II	I	Mesenteric thrombosis
11	2	75–80	M	E4/E3	I	B	II	II	Metastatic prostate adenocarcinoma
12	2	80–85	F	E2/E3	III	A	II	II	Intracerebral hemorrhage
13	2	80–85	F	E3/E3	–	–	II	I	Secondary amyloidosis
14	2	70–75	F	E3/E3	–	–	II	I	Metastatic breast carcinoma
15	3	75–80	F	E3/E3	I	A	–	–	Acute meningitis
16	3	55–60	F	E3/E3	II	C	–	–	Ischemic stroke
17	3	75–80	F	E3/E3	I	B	–	–	Acute pneumonia
18	4	50–55	M	E4/E3	–	–	–	–	Pulmonary hypertension
19	4	60–65	F	E3/E3	–	–	–	–	Large B cell lymphoma
20	4	70–75	M	E4/E3	–	–	–	–	Multiple Myeloma

F, female; M, male.

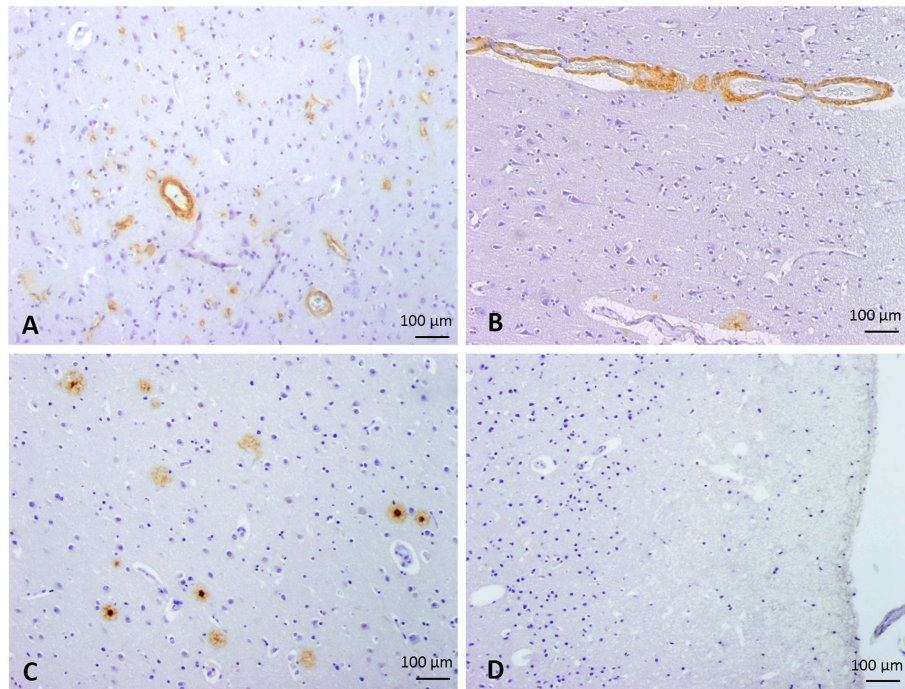


FIGURE 1 | Classification of cases into 4 groups according to the parenchymal and vascular A β deposition by immunostaining. Representative images of A β immunohistochemistry. **(A)** Group 1: CAA type I, defined by the presence of capillary and arterial A β deposits. **(B)** Group 2: CAA type II, defined by the presence of arterial A β deposits without capillary involvement. **(C)** Group 3, characterized by the presence of parenchymal A β deposits without vascular involvement. **(D)** Group 4, defined by the absence of A β deposits (control cases). 100x magnification.

CAA type I and CAA type II was made according to the criteria described by Thal et al. (presence and absence of capillary A β deposits in types I and II, respectively) (1). Alzheimer disease

pathology was evaluated and staged according to Braak (21) and CERAD's criteria (22) through immunohistochemistry using the mouse anti-human Amyloid- β Clone 6F/3D 1:500 (Dako,

Glostrup, Denmark) and the mouse anti-human Tau protein Clone AT8 1:20 (Thermo Scientific, Rockford, USA).

Immunohistochemistry

To describe a representative distribution of A β deposits, up to 3 blocks from cortical areas, including perihippocampal cortex in five cases, were selected in order to evaluate an equivalent number of meningeal and cortical vessels (20–30 per case). Brainstem and cerebellar areas were not used in this study. Consecutive sections of the selected blocks were performed for the detection of ApoE, ApoJ, and ApoA-I. In those samples from patients who suffered an ICH, the immunopositivity of the different apolipoproteins were evaluated outside the lesion.

Paraffin was removed, endogenous peroxidases were blocked with methanol-H₂O₂, and non-specific binding sites were blocked with 10% normal goat serum for 1 h. Sections were incubated with mouse anti-human ApoE 1:200 (Clone E6D7, Calbiochem—NE1004, Madrid, Spain), mouse anti-human ApoJ 1:1,000 (Clone 5 BD Pharmingen —552886, Madrid, Spain) and rabbit anti-human ApoA-I 1:200 (Clone EP1368Y, Abcam—ab52945, Cambridge, UK) for 40 min at RT. Secondary antibody (goat anti-mouse horseradish peroxidase, 1:500) was applied for 8 min. Immunoreactive sites were developed with DAB solution and serial sections were stained with hematoxylin & eosin (H&E) to assess morphology. Meningeal and cortical vessels, neurons, subpial astrocytes, and parenchymal deposits in cortical and perihippocampal areas were semi-quantitatively evaluated. Blind to the group distribution, two neuropathologists assessed the three antibodies under a multithreaded microscope until agreement was reached.

ApoE, ApoJ, and ApoA-I Immunopositivity Scores

Supplemental Table 1 summarizes the scores used for the vascular and parenchymal immunodetection. The presence of ApoE, ApoJ, and ApoA-I immunostaining in cortical and meningeal arteries was graded according to the percentage of arteries showing immunopositivity: score 0 was given when no positive arteries could be found; score 1 indicated <30% of positive arteries; score 2 corresponded to 30–75% of positive arteries; and score 3 indicated immunopositivity in more than 75% of the evaluated arteries. ApoE, ApoJ, and ApoA-I presence in cortical capillaries was evaluated in 10 high-power field (HPF) and scored as follows: score 0 when no signal was detected in cortical capillaries; score 1 when the signal was focal (in fewer than 50% of the capillaries); score 2 when the signal was focal and linear (in fewer than 50% of the capillaries); score 3 when the signal was diffuse (in more than 50% of capillaries); and score 4 when the signal was strong and thick in the capillaries. ApoE, ApoJ, and ApoA-I parenchymal deposits were evaluated in 10 HPF, after detecting the hotspot for each block, and graded according to the number of parenchymal deposits, divided into neuritic-like plaques (with a dense core surrounded by a clear halo and, sometimes, a neuritic corona) and diffuse-like plaques (without any central core): score 0 indicated absence of parenchymal deposits; score 1 indicated sparse deposits (<5/HPF); score 2 indicated a moderate number

of deposits (5–10/ HPF); and score 3 indicated frequent deposits (>10/ HPF). Immunodetection of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in the cytoplasm of subpial astrocytes and pyramidal neurons was semi-quantitatively rated as: absence, mild, moderate, or intense expression.

APOE Genotype

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using EZ1 DNA Tissue kit (48) and Bio Robot EZ1 (Qiagen, Hilden, Germany). APOE genotypes (rs429358 and rs7412) were determined by allelic discrimination using the SNP genotyping mixes C-3084793 and C-904973 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the TaqMan_Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) in a Rotor Gene 6000 Real-Time PCR analyzer (Corbett Life Sciences, Valencia, CA, USA).

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using SPSS package 17.0. Clinical or pathological associations with age (continuous variable following a normal distribution after applying the Kolmogorov–Smirnov test) were tested using the Student's *t*-test or One-way ANOVA test, as appropriate. The rest of the variables analyzed were considered categorical variables and the significance of frequency differences were calculated using the Chi Square (χ^2) test or the exact test of Fisher for 2 \times 2 contingency tables. Logistic regression analysis were performed to identify independent associations with the apolipoproteins expression. A *p* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

ApoE, ApoJ, and ApoA-I cerebral levels and localization were analyzed in brains from the four different groups of patients categorized according to the parenchymal and vascular A β deposition determined by immunostaining (**Figure 1**). Principal demographic characteristics, AD, and CAA pathological scores and APOE genotype of all patients included in the study can be found in **Table 1**. CAA cases (encompassing groups 1 and 2) were significantly older than non-CAA cases (encompassing groups 3 and 4) (81 ± 7 vs. 66 ± 12 , *p* = 0.026). As expected, ICH was the cause of death in CAA patients more often than in non-CAA cases [50% (7/14) vs. 0% (0/6), *p* = 0.036]. Among CAA patients, no differences were found in age (*p* = 0.983), sex (*p* = 0.774), or cause of death between CAA type I (group 2) and type II (group 1) cases (*p* = 0.298). However, APOE ϵ 4 genotype was more represented in CAA type I patients than in those lacking capillary CAA (type II) [67% (4/6) vs. 13% (1/8), *p* = 0.036]. CAA type II cases had a slightly higher ϵ 2 allele frequency than CAA type I, although differences were not significant [38% (3/8) vs. 17% (1/6), *p* = 0.393]. APOE genotype was not statistically associated with sex, age or other pathological scores. However, APOE genotype was associated with having suffered an ICH (*p* = 0.017). Interestingly, CAA patients with ICH had a significantly higher APOE ϵ 2 genotype frequency compared with CAA patients without ICH [57% (4/7) vs. 0% (0/7), *p* = 0.018].

The presence of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in cortical and meningeal arteries, capillaries, neuritic-like, and diffuse parenchymal deposits was evaluated by immunohistochemistry. Examples of immunopositivity for each case are shown in **Figure 2**. Parenchymal ApoE, ApoJ, and ApoA-I presence was also analyzed within brain cells (**Supplemental Figure 1**).

ApoE, ApoJ, and ApoA-I Presence in Cerebral Arteries

In meningeal vessels, ApoE positivity was not significantly different among groups ($p = 0.307$): score 3 was given to 67% (4/6) of CAA type I, 50% (4/8) of CAA type II, and 33% (1/3) of control cases. ApoJ levels in meningeal vessels were higher than ApoE but was equally represented in all groups ($p = 0.448$). The highest ApoJ level score (score 3) was given to 83% (5/6) of CAA type I cases, 87% (7/8) of CAA type II cases, 67% (2/3) of brains with parenchymal A β deposits without A β vascular involvement and 67% (2/3) of control cases. ApoA-I showed a lower presence in meningeal vessels than ApoE or ApoJ and did not differ among groups ($p = 0.905$); most of the samples received scores of 1 or 0. Expression of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in the meningeal arteries was not significantly different between CAA type I and CAA type II cases or between CAA and non-CAA cases (**Figure 3A**, **Supplemental Table 2**). APOE genotype was not associated with the expression of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in meningeal arteries.

Regarding the presence of these apolipoproteins in cortical arteries, ApoE showed a score of 3 in 50% (3/6) of CAA type I and 63% (5/8) of CAA type II cases. Interestingly, cortical vessels from brains with parenchymal A β deposits without vascular A β involvement were not positive for ApoE (all cases scored 0), but the differences among the 4 groups did not reach statistical significance ($p = 0.114$). ApoJ vascular cortical positivity was higher than ApoE, showing a score of 3 in all (100%, 6/6) CAA type I cases, in 63% (2/3) of CAA type II cases and in 33% (1/3) of brains with parenchymal A β deposits without vascular involvement. ApoJ expression in the cortical vessels of controls was lower than in those cases with cerebral A β accumulation ($p = 0.048$). Presence of ApoA-I was also less frequent in cortical vessels and was similarly distributed among groups ($p = 0.441$). Expression of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in cortical arteries was not significantly different between CAA type I and CAA type II cases. However, CAA brains presented a higher percentage of ApoE-positive cortical vessels than non-CAA cases ($p = 0.099$), and this was especially relevant for ApoJ ($p = 0.018$) (**Figure 3B**, **Supplemental Table 2**). In addition, the presence of ApoE in cortical arteries was nearly significantly related to the APOE ϵ 2 genotype ($p = 0.058$).

ApoE, ApoJ, and ApoA-I Presence in Brain Cortical Capillaries

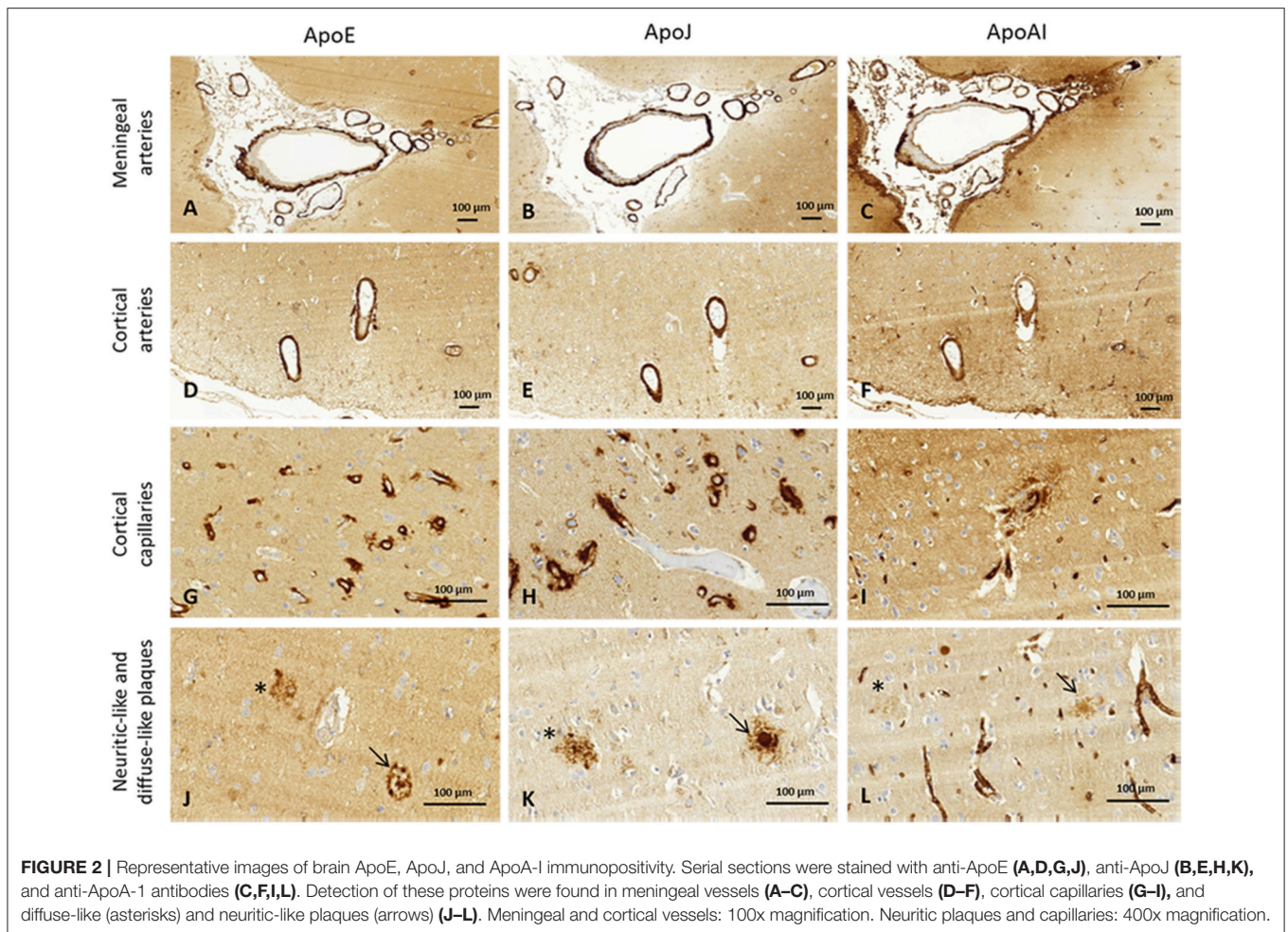
ApoE staining in the capillaries scored 4 in 83% (5/6) of CAA type I cases (group 1), in which the presence was higher than in the other groups ($p = 0.002$). In fact, ApoE expression in brain capillaries was significantly more abundant in CAA type I cases than in CAA type II cases ($p = 0.004$). ApoJ positivity in the capillaries followed the same pattern as ApoE:

100% (6/6) of CAA type I cases presented the highest score in ApoJ levels (score 4), whereas the mean score was lower in the other groups ($p = 0.001$). ApoJ presence was also stronger in microvessels affected by A β accumulation, so levels were higher in brain capillaries from CAA type I cases than from CAA type II cases ($p = 0.002$). Interestingly, ApoA-I positivity in the capillaries was more pronounced globally and more homogenous between groups, although microvessels from CAA type I samples also presented the highest score in 83% (5/6) of the cases, which was more often than the other groups ($p = 0.006$). Indeed, ApoA-I levels in brain capillaries were also significantly higher in CAA type I cases than in CAA type II cases ($p = 0.003$) (**Figure 4**, **Supplemental Table 2**). In addition, potential associations between ApoE, ApoJ, and ApoA-I presence in brain capillaries and APOE genotype were determined. In this regard, only the expression of ApoE protein in capillaries was related to APOE ϵ 4 genotype ($p = 0.035$), although the association did not achieve statistical significance after the adjustment by age and CAA subtype (odds ratio (OR) 2.32; 95% confidence interval (CI) [0.97–5.87], $p = 0.073$).

ApoE, ApoJ, and ApoA-I Parenchymal Accumulation

Frequent ApoE neuritic-like plaques (score 3) were found in 50% (3/6) of CAA type I cases, 63% (5/8) of CAA type II cases and 67% (2/3) of cases with parenchymal A β deposits without vascular involvement. No ApoE neuritic-like plaques were found in control cases (differences among the 4 groups: $p = 0.002$). Similarly, 33% (2/6) of CAA type I and 63% (5/8) of CAA type II cases showed frequent ApoJ neuritic-like plaques (score 3), whereas there were lower scores in cases with parenchymal A β deposits without vascular involvement and no ApoJ neuritic-like plaques in control cases ($p = 0.002$). ApoA-I deposits were almost absent in all of the analyzed samples, and the distribution was not different among groups ($p = 0.490$). No differences were found in the number of ApoE, ApoJ, or ApoA-I neuritic-like plaques between CAA type I and type II cases (**Figure 5A**, **Supplemental Table 2**). APOE genotype was not associated with the presence of ApoE, ApoJ, and ApoA-I forming neuritic or diffuse-like parenchymal deposits

Frequent ApoE diffuse-like plaques (score 3) were found in 50% (3/6) of CAA type I cases, in 63% (5/8) of CAA type II cases and 67% (2/3) of cases with parenchymal A β deposits without vascular A β involvement. Brain samples from controls presented fewer ApoE diffuse-like plaques, although differences among the 4 groups were not statistically significant ($p = 0.389$). The presence of ApoJ forming diffuse-like plaques was frequent (score 3) in 33% (2/6) of CAA type I and 63% (5/8) of CAA type II cases, in comparison with a lower detection in the rest of the groups ($p = 0.017$). Although ApoE and ApoJ diffuse-like plaques were found in 67% (2/3) of controls, groups 3 and 4 presented lower scores compared with CAA groups 1 and 2 in both cases. ApoA-I diffuse-like plaques were globally less frequent than ApoE and ApoJ, without significant differences among groups ($p = 0.234$). Presence of ApoE, ApoJ, or ApoA-I in diffuse-like plaques was also not different between CAA



type I and type II cases (Figure 5B, Supplemental Table 2). APOE genotype was not associated with the presence of ApoE, ApoJ, and ApoA-I forming neuritic or diffuse-like parenchymal deposits in our cohort.

ApoE, ApoJ, and ApoA-I were expressed in the cytoplasm of pyramidal neurons and subpial astrocytes from different cortical and perihippocampal areas analyzed. No differences in the number of positive cells nor in the intensity of the expression were detected for ApoE, ApoJ, or ApoA-I among the 4 groups analyzed or between CAA type I and CAA type II cases. ApoE, ApoJ, and ApoA-I immunopositivity in pyramidal neurons and subpial astrocytes are presented in Supplemental Figure 1.

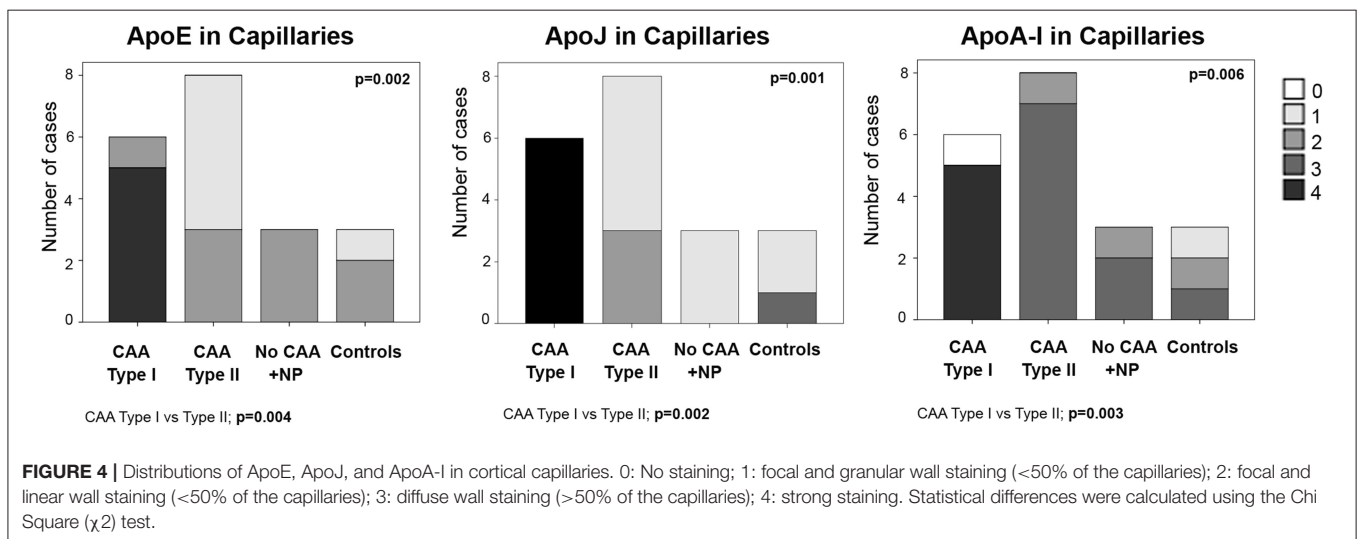
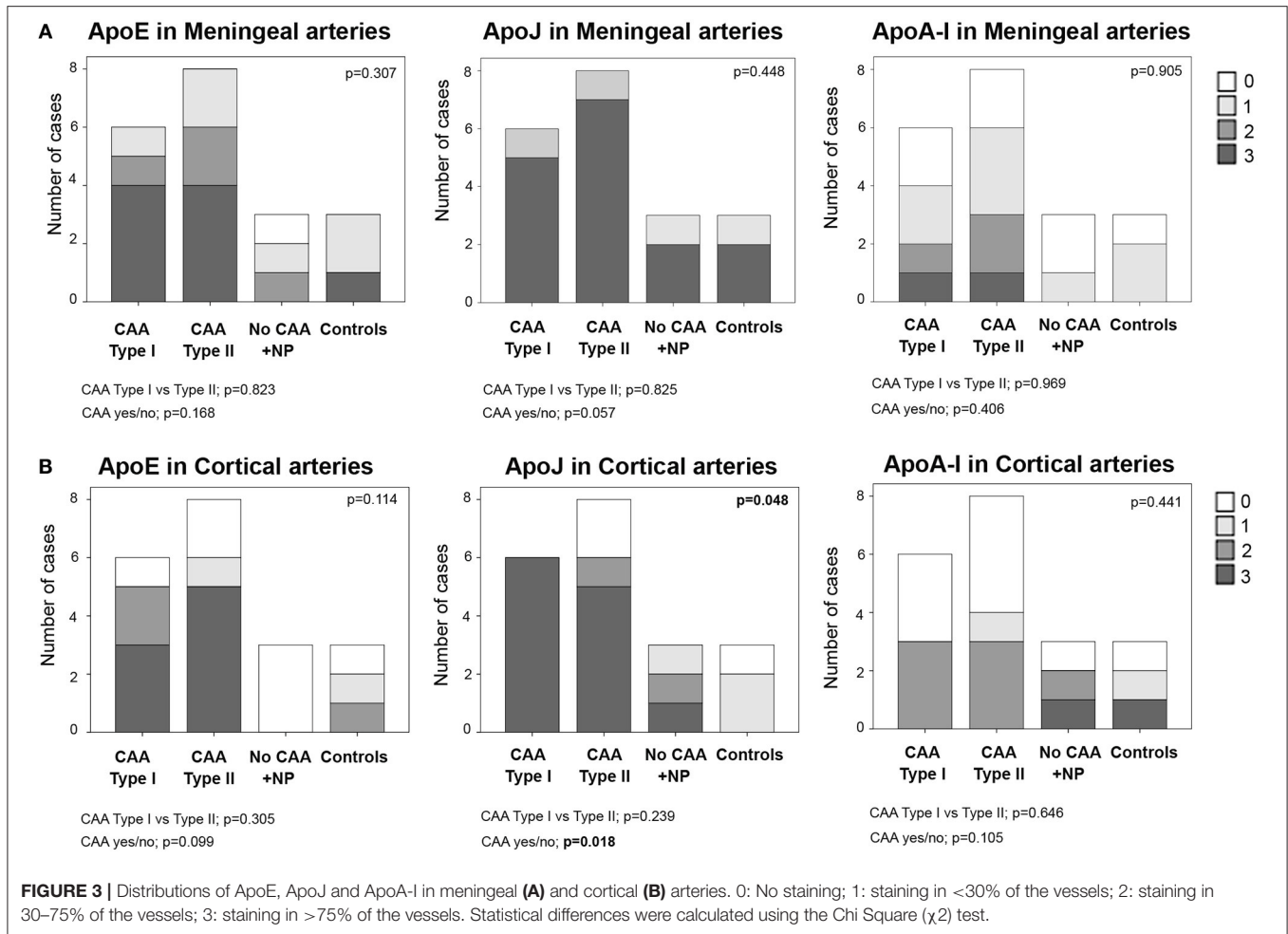
Vascular ApoE, ApoJ, and ApoA-I Levels Associated With ICH

In the cohort of analyzed postmortem brains, lobar ICH was the principal cause of death among CAA patients ($N = 7$, Table 1). Sex was not associated with ICH presence, but subjects who suffered an ICH were older than the others (83 ± 6 vs. 73 ± 11 , $p = 0.040$). We evaluated the possible association between the levels of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in brain vessels and the occurrence of a parenchymal bleeding, although apolipoprotein

presence was evaluated far from the acute hematoma in ICH cases. In this regard, ApoE was significantly higher in capillaries and in meningeal and cortical arteries in those patients who suffered an ICH ($p = 0.035$, $p = 0.048$, and $p = 0.015$, respectively) (Figure 6), although ApoE immunodetection was not associated with age. In contrast, ApoE levels in diffuse or neuritic-like plaques were not different in patients who suffered an ICH. ApoA-I levels in meningeal arteries were higher in ICH patients than in the other subjects ($p = 0.006$). Finally, ApoJ parenchymal presence was not statistically associated with ICH in this cohort (Figure 6). Nevertheless, after adjusting for age and APOE genotype, higher ApoE presence in cortical arteries was the only independent predictor of suffering an ICH (OR, 9.40, 95% CI [1.05–84.41], $p = 0.046$).

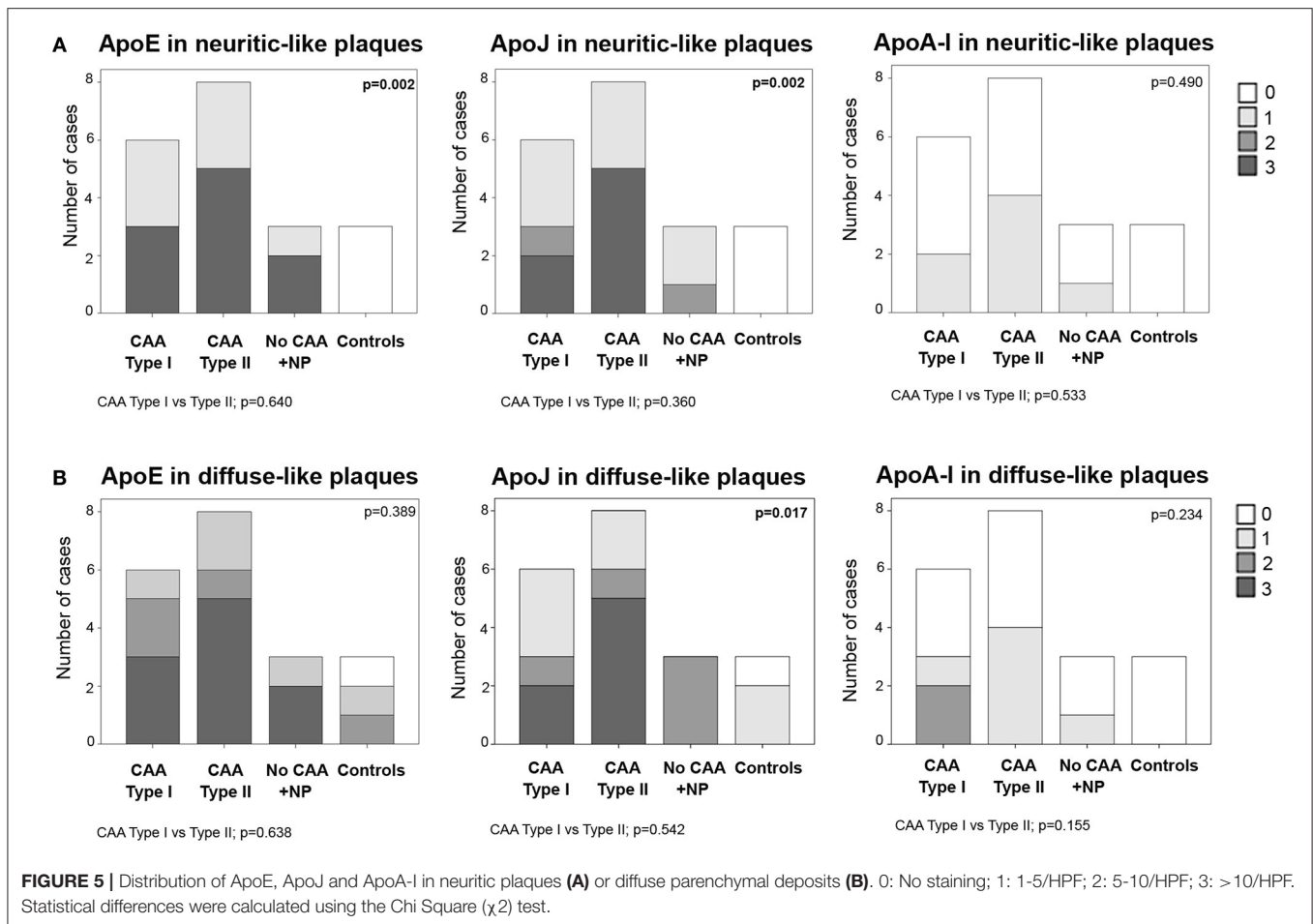
DISCUSSION

It is still not completely clear why A β accumulates in the brain in certain neuropathological conditions, such as AD and CAA. Although certain inherited forms of CAA presenting cerebral hemorrhage are associated with autosomal dominant mutations in APP and other genes [including the cystatin C (CST3), integral



transmembrane protein 2B (ITM2B), transthyretin and gelsolin genes] in most cases, sporadic CAA does not clearly associate with any genetic risk factor other than the association described for APOE ϵ 4 (10, 23). One of the most accepted hypotheses

that tries to explain the sporadic cerebrovascular A β deposition refers to “protein elimination failure” due to a deficit in protein aggregate clearance mechanisms (24). The cerebrovasculature is the main system responsible for the clearance of cerebral A β ,



which is evacuated through perivascular drainage routes and excluded through the blood-brain barrier (BBB). The fibrillar and compact A β deposition in the brain vessel walls has been related to abnormalities in the vasculature, which can subsequently compromise the integrity of the BBB. Indeed, the most relevant pathological consequence of CAA is the development of ICHs affecting cortical and subcortical areas. Furthermore, recurrence is a common complication in CAA patients, which results in elevated mortality and disability rates (25). Nevertheless, the mechanisms of vessel rupture triggering ICH due to A β deposition have not been clarified either. In this regard, our aim was to study the presence of factors that codeposit with A β in brains showing different A β localization patterns. In particular, we analyzed specific apolipoproteins, ApoE, ApoJ, and ApoA-I, which may influence the insoluble deposit aggregation and clearance (13–16) and therefore can be relevant in the distribution of A β in the brain.

Brain ApoE is produced by glia (astrocytes and microglia), pericytes, smooth muscle cells, and, to a much lesser extent, by neurons under certain stress conditions and, potentially, in brain endothelial cells. ApoE modulates multiple mechanistic pathways that affect cognition, including cholesterol/lipid homeostasis, synaptic function, glucose metabolism,

neurogenesis, mitochondrial function, tau phosphorylation, neuronal atrophy, neuroinflammation, and the metabolism and aggregation of A β (26). Previous immunohistochemical studies in AD brains revealed the presence of ApoE in parenchymal deposits and in the wall of brain vessels, where the ApoE level correlated with A β deposits (8, 27, 28). Our results confirm some of these previous findings, as we detected higher parenchymal ApoE levels in brains where a previous presence of A β , forming neuritic plaques, was confirmed. However, no significant differences were found in the ApoE level in meningeal arteries affected or not by CAA, although a tendency toward a higher ApoE presence was observed in cortical vessels from CAA brains than those from non-CAA brains.

Several evidences have demonstrated that APOE genotype modifies the distribution of cerebrovascular A β in AD individuals (23, 29). In this regard, we studied whether the APOE genotype could also influence the expression of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in CAA cases. Although APOE ϵ 4 is a well-known risk factor for CAA (10, 23), we could not show this association in our study, probably because of the small sample size of the control group (cases without A β pathology). However, among CAA cases, we found that APOE ϵ 4 genotype was more represented in CAA type I patients, whereas CAA type II patients seemed to present

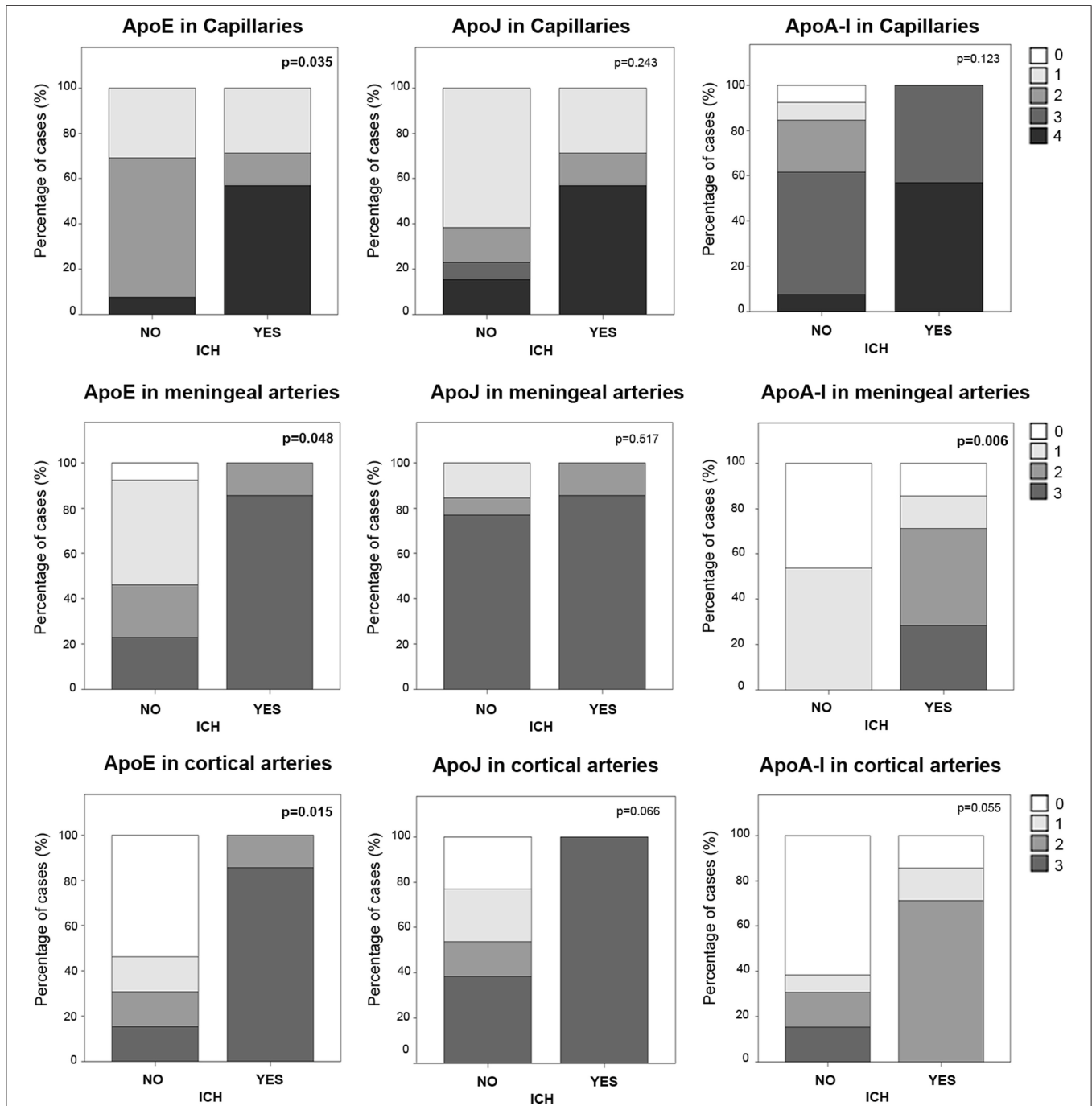


FIGURE 6 | Distribution of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in capillaries and meningeal and cortical arteries in brains from subjects who had an intracerebral hemorrhage (ICH) or not. Graphs represent the percentage of samples in each group (presenting ICH or not). The presence in brain capillaries was classified as 0: no staining; 1: focal and granular wall staining (<50% of the capillaries); 2: focal and linear wall staining (<50% of the capillaries); 3: diffuse wall staining (>50% of the capillaries); 4: strong staining. The presence in brain arteries was classified as 0: no staining; 1: staining in <30% of the vessels; 2: staining in 30–75% of the vessels; 3: staining in >75% of the vessels. Statistical differences were calculated using the Chi Square (χ^2) test.

higher APOE ϵ 2 frequency, in accordance with previous studies (1, 30). No significant association could be found between the immunodetection of ApoE, ApoJ, or ApoA-I and the APOE genotype, except for a statistical trend pointing toward a link

between APOE ϵ 2 genotype and higher presence of ApoE in cortical arteries. In fact, in CAA-associated ICH patients, our group previously showed higher plasma ApoE protein levels in APOE ϵ 2 carriers (31). On the other hand, the presence of either

APOE ϵ 4 or APOE ϵ 2 have been described to increase the risk of lobar ICH (32). Previous pathological studies demonstrated that APOE ϵ 2 may promote the CAA-related vessel breakdown (33), whereas APOE ϵ 4 was associated with the amount of vascular amyloid (10). Interestingly, in our cohort, CAA patients with ICH more commonly were APOE ϵ 2 carriers compared with CAA patients without ICH, validating the results described previously (34). In addition to this, the presence of ApoE in cortical vessels was significantly higher in patients who suffered an ICH, after adjusting for APOE genotype and age. This data suggests the possible role of this apolipoprotein in the destabilization and disruption of brain vessels, as proposed in different experimental models (35, 36).

ApoJ is a multifunctional heterodimeric protein that acts as a natural chaperone. ApoJ binds to A β in CSF and plasma (37), and increased plasma ApoJ has been associated with a higher prevalence and severity of AD (38). In AD brains, ApoJ codeposits with A β in cerebrovascular and parenchymal lesions (27, 39, 40). Once again, the results from our study are in accordance with the published data, since we clearly confirmed higher ApoJ levels in brain vessels from CAA cases and in parenchymal neuritic-like and diffuse-like deposits in cases presenting A β plaques. However, it is worth mentioning that ApoJ and ApoE diffuse-like deposits were also found in some control cases, where no deposits of A β were detected in parenchyma. The use of more sensitive immunodetection methods (for example, using A β antibodies that recognize different epitopes) would be required to confirm these results. The increased levels of ApoJ has been postulated as a protective response against the aberrant accumulation of A β in the brain. However, there are conflicting results in the literature regarding the protective role of ApoJ. Knocking out *CLU* in a transgenic mouse model of AD resulted in an exacerbation of vascular A β deposition, whereas parenchymal A β deposition was remarkably reduced (41). In another study, intraventricular administration of an ApoJ-mimetic peptide promoted a reduction in parenchymal and vascular A β accumulation and improved cognitive function in an experimental AD model (42). Thus, the impact of the alteration of the ApoJ level in the brain still needs to be clarified. In our study, in contrast to ApoE, no significant association was found between ApoJ cerebrovascular levels and the occurrence of ICH.

Finally, ApoA-I is a major constituent of high-density lipoprotein (HDL) in plasma and plays a crucial role in reverse cholesterol transport. It is produced mainly in the liver and intestine, but ApoA-I is considered to be able to cross the BBB (43) because it has been found in CSF and throughout the brain (44), although the mechanisms behind this trafficking are not well-described. In fact, in AD brains, ApoA-I has been associated with senile plaques (8, 27), although it is not clear whether this plaque-associated ApoA-I comes from the periphery or whether it is expressed by specific brain cells, such as endothelial capillary cells (45). In the present study, ApoA-I was also found in occasional brain parenchymal deposits. However, ApoA-I positivity was less diffuse than ApoE and ApoJ in meningeal and cortical arteries, and there was no association between ApoA-I levels and A β arterial deposition.

Another important aim of our study was to determine whether these codeposition factors were present when cases were classified according to A β capillary involvement. Indeed, the clinical relevance of the CAA neuropathological classification is under investigation. For instance, one study found that CAA type I seems to be associated with the severity of CAA, dementia and severe AD-type neuropathology (46), while another study reported that the associations of CAA with cognitive outcomes were not driven by the presence of capillary involvement (47). In our study, CAA capillary involvement was not associated with the CAA or AD pathological severity. CAA subtype was not related to ICH occurrence either. On the other hand, the biological pattern of both CAA entities has not been studied extensively (48). In this context, the expression of these apolipoproteins in cerebral vessels affected by A β deposition was previously described (27, 28), although no specific reports have described a possible differential distribution pattern depending on the CAA pathological classification. Therefore, we determined the levels and localizations of ApoE, ApoJ, and ApoA-I in brains classified as CAA type I or type II. We found that the presence of the three apolipoproteins in capillaries from CAA cases was more evident than in those from non-CAA cases. Furthermore, the endothelial expression levels of ApoE and ApoJ, as well as those of ApoA-I, were higher in the CAA type I capillaries than in the CAA type II capillaries. In fact, endothelial expression with strong and thick wall staining and, sometimes, perivascular deposits was found in CAA type I capillaries, while only endothelial expression without significant wall staining was found in CAA type II capillaries. Interestingly, our results highlight the relevant specific association between ApoA-I presence and capillary A β , although whether this ApoA-I has a peripheral origin and is attracted by the microvascular A β or this is a specific expression mechanism in endothelial cells needs to be elucidated. Furthermore, higher levels of ApoE and ApoA-I were also detected in capillaries from patients who suffered an ICH, independently of the CAA subtype, suggesting the possible involvement of the accumulation of these two apolipoproteins in the alteration of some properties associated to the BBB integrity.

In summary, ApoE and ApoJ appear to be involved in both vascular and parenchymal A β pathology, while ApoA-I seems to be mainly associated with CAA, especially in CAA type I. In addition, ApoE presence in cortical arteries appears as an independent factor for the occurrence of ICH in CAA. Our study presents important limitations, such as the small sample size of the subgroups (principally evident for the non-CAA groups) or the analysis of different cortical areas, which may have influenced the apolipoprotein immunodetection rating. Further studies are needed to evaluate the impact of the co-deposition of these apolipoproteins in A β -related pathologies and in the occurrence of CAA-associated ICH.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MH-G and EM-S designed and coordinated the study. JC participated in the design of the study. SR advised on the theoretical aspects of the study. TM performed the

immunohistochemistry analysis. JC and EM-S selected brain samples and revised all the immunohistochemistry analysis until agreement was reached. AB-P performed the APOE genotype analysis from paraffin-embedded sections. JC, EM-S, and MH-G wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [CP12/03259, PI14/01134, and PI17/00275],

co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). The Neurovascular Research Laboratory is part of the *INVICTUS+* network, ISCIII, Spain [RD16/0019/0021]. MH-G is supported by the Miguel Servet programme, ISCIII, Spain [CPII17/00010].

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00187/full#supplementary-material>

REFERENCES

1. Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2002) 61:282–93. doi: 10.1093/jnen/61.3.282
2. Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, Frosch MP, et al. Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain.* (2017) 140:1829–50. doi: 10.1093/brain/awx047
3. Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, Wilson RS, Bennett DA, Schneider JA. Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Ann Neurol.* (2011) 69:320–7. doi: 10.1002/ana.22112
4. Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2012) 83:124–37. doi: 10.1136/jnnp-2011-301308
5. Zhang-Nunes SX, Maat-Schieman MLC, van Duinen SG, Roos RAC, Frosch MP, Greenberg SM. The cerebral beta-amyloid angiopathies: hereditary and sporadic. *Brain Pathol.* (2006) 16:30–9. doi: 10.1111/j.1750-3639.2006.tb00559.x
6. Uro-Coste E, Russano de Paiva G, Guilbeau-Frugier C, Sastre N, Ousset PJ, da Silva NA, et al. Cerebral amyloid angiopathy and microhemorrhages after amyloid beta vaccination: case report and brief review. *Clin Neuropathol.* (2010) 29:209–16. doi: 10.5414/NPP29209
7. Cho HS, Hyman BT, Greenberg SM, Rebeck GW. Quantitation of apoE domains in Alzheimer disease brain suggests a role for apoE in Abeta aggregation. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2001) 60:342–9. doi: 10.1093/jnen/60.4.342
8. Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B. Conformational mimicry in Alzheimer's disease. Role of apolipoproteins in amyloidogenesis. *Am J Pathol.* (1995) 147:238–44.
9. Saunders AM, Schmeider K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet.* (1993) 342:710–1. doi: 10.1016/0140-6736(93)2991709-U
10. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, Kokoris GJ, Takis C, Kanter DS, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke.* (1996) 27:1333–7. doi: 10.1161/01.STR.27.8.1333
11. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* (2009) 41:1094–9. doi: 10.1038/ng.439
12. Tan L, Wang HF, Tan MS, Tan CC, Zhu XC, Miao D, et al. Effect of CLU genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging markers in healthy, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease cohorts. *Sci Rep.* (2016) 6:26027. doi: 10.1038/srep26027
13. Matsubara E, Frangione B, Ghiso J. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J Biol Chem.* (1995) 270:7563–7.
14. Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Governale S, Miguel C, Miao W, et al. 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.* (1997) 69:1995–2004.
15. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, et al. 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). 27:909–918. doi: 10.1038/sj.cbfm.9600419
16. Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterova MI, Lazo JS. Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry.* (2001) 40:3553–60. doi: 10.1021/bi002186k
17. Paula-Lima AC, Tricerri MA, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Oliveira FF, Magdesian MH, et al. Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Abeta-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* (2009) 41:1361–70. doi: 10.1016/j.biocel.2008.12.003
18. Merino-Zamorano C, Fernández-de Retana S, Montaña A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, et al. Modulation of Amyloid-β1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ across an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis.* (2016) 53:677–91. doi: 10.3233/JAD-150976
19. Vonsattel JP, Myers RH, Hedley-Whyte ET, Ropper AH, Bird ED, Richardson EP. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. *Ann Neurol.* (1991) 30:637–49. doi: 10.1002/ana.410300503
20. Greenberg SM, Vonsattel JP. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke.* (1997) 28:1418–22. doi: 10.1161/01.STR.28.7.1418
21. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* (2006) 112:389–340. doi: 10.1007/s00401-006-0127-z
22. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Grain BJ, Brownlee LM, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* (1991) 41:479–86.
23. Trembath D, Ervin JE, Broom L, Szymanski M, Welsh-Bohmer K, Pieper C, et al. The distribution of cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease varies with ApoE genotype. *Acta Neuropathol.* (2007) 113:23–31. doi: 10.1007/s00401-006-0162-9
24. Carare RO, Hawkes CA, Jeffrey M, Kalaria RN, Weller RO. Review: cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (2013) 39:593–611. doi: 10.1111/nan.12042
25. Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke.* (2004) 35(Suppl. 1):2616–9. doi: 10.1161/01.STR.0000143224.36527.44
26. Tai LM, Thomas R, Marottoli FM, Koster KP, Kanekiyo T, Morris AWJ, et al. The role of APOE in cerebrovascular dysfunction. *Acta Neuropathol.* (2016) 131:709–23. doi: 10.1007/s00401-016-1547-z
27. 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) 66:2429–35.
28. 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) 541:163–6.

29. Love S, Chalmers K, Ince P, Esiri M, Attems J, Jellinger K, et al. Development, appraisal, validation and implementation of a consensus protocol for the assessment of cerebral amyloid angiopathy in post-mortem brain tissue. *Am J Neurodegener Dis.* (2014) 3:19–32.
30. Thal DR, Papassotiropoulos A, Saito TC, Griffin WS, Mrak RE, Kölsch H, et al. Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE epsilon4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* (2010) 120:169–83. doi: 10.1007/s00401-010-0707-9
31. Montañola A, de Retana SF, López-Rueda A, Merino-Zamorano C, Penalba A, Fernández-Álvarez P, et al. ApoA1, ApoJ and ApoE plasma levels and genotype frequencies in cerebral amyloid angiopathy. *Neuromol Med.* (2016) 18:99–108. doi: 10.1007/s12017-015-8381-7
32. Woo D, Sauerbeck LR, Kissela BM, Khoury JC, Szaflarski JP, Gebel J, et al. Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. *Stroke.* (2002) 33:1190–5. doi: 10.1161/01.STR.0000014774.88027.22
33. Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Dewar D, Ironside JW, et al. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 allele in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* (1997) 41:716–21. doi: 10.1002/ana.410410607
34. Charidimou A, Martínez-Ramírez S, Shoamanesh A, Oliveira-Filho J, Frosch M, Vashkevich A, et al. Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: evidence for different disease phenotypes. *Neurology.* (2015) 84:1206–12. doi: 10.1212/WNL.0000000000001398
35. Teng Z, Guo Z, Zhong J, Cheng C, Huang Z, Wu Y, et al. ApoE influences the blood-brain barrier through the NF- κ B/MMP-9 pathway after traumatic brain injury. *Sci Rep.* (2017) 7:6649. doi: 10.1038/s41598-017-06932-3
36. Pang J, Chen Y, Kuai L, Yang P, Peng J, Wu Y, et al. Inhibition of blood-brain barrier disruption by an apolipoprotein E-mimetic peptide ameliorates early brain injury in experimental subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res.* (2017) 8:257–72. doi: 10.1007/s12975-016-0507-1
37. Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, et al. 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.* (1993) 293(Pt 1):27–30.
38. Schrijvers EMC, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA.* (2011) 305:1322–6. doi: 10.1001/jama.2011.381
39. McGeer PL, Kawamata T, Walker DG. Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* (1992) 579:337–41. doi: 10.1016/0006-8993(92)90071-G
40. Manousopoulou A, Gatherer M, Smith C, Nicoll JAR, Woelk CH, Johnson M, et al. Systems proteomic analysis reveals that clusterin and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 increase in leptomeningeal arteries affected by cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (2017) 43:492–504. doi: 10.1111/nan.12342
41. Wojtas AM, Kang SS, Olley BM, Gatherer M, Shinohara M, Lozano PA, et al. Loss of clusterin shifts amyloid deposition to the cerebrovasculature via disruption of perivascular drainage pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:E6962–71. doi: 10.1073/pnas.1701137114
42. Qi XM, Wang C, Chu XK, Li G, Ma JF. Intraventricular infusion of clusterin ameliorated cognition and pathology in Tg(6799). *BMC Neurosci.* (2018) 19:2. doi: 10.1186/s12868-018-0402-7
43. Balazs Z, Panzenboeck U, Hammer A, Sovic A, Quehenberger O, Malle E, et al. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an *in vitro* blood-brain barrier model. *J Neurochem.* (2004) 89:939–50. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02373.x
44. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol.* (2001) 12:105–12. doi: 10.1097/00041433-200104000-00003
45. Möckel B, Zinke H, Flach R, Weiss B, Weiler-Güttler H, Gassen HG. Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium *in vitro*. *J Neurochem.* (1994) 62:788–98. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62020788.x
46. Mäkelä M, Paetau A, Polvikoski T, Myllykangas L, Tanskanen M. Capillary amyloid- β protein deposition in a population-based study (Vantaa 85+). *J Alzheimers Dis.* (2016) 43:492–504. doi: 10.3233/JAD-150241
47. Boyle PA, Yu L, Nag S, Leurgans S, Wilson RS, Bennett DA, et al. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology.* (2015) 85:1930–6. doi: 10.1212/WNL.0000000000002175
48. Matsuo K, Shindo A, Niwa A, Tabei, KI, Akatsu H, Hashizume Y, et al. Complement activation in capillary cerebral amyloid angiopathy. *Dement Geriatr Cogn Disord.* (2017) 44:343–53. doi: 10.1159/000486091

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

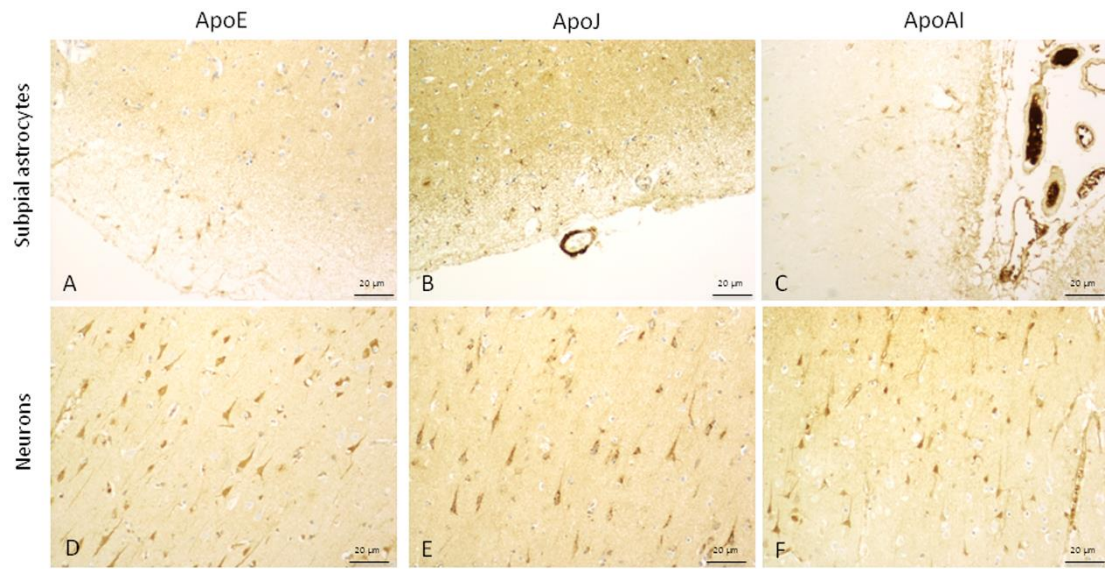
Copyright © 2019 Camacho, Moliné, Bonaterra-Pastra, Ramón y Cajal, Martínez-Sáez and Hernández-Guillamon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplemental Material

Supplemental Table 1. ApoE, ApoJ and ApoA-I immunopositivity scores

	Cortical capillaries	Meningeal and cortical vessels	Parenchymal deposits
0	No staining	No staining	No staining
1	Focal and granular wall staining (<50% of the capillaries)	Staining of <30% of the vessels evaluated	Sparse deposits (<5/ high-power field)
2	Focal and linear wall staining (<50% of the capillaries)	Staining 30-75% of the vessels evaluated	Moderate number of deposits (5-10/ high-power field)
3	Diffuse wall staining (> 50% of capillaries)	Staining >75% of the vessels evaluated	Frequent deposits (>10/ high-power field)
4	Strong and thick staining in the capillaries		

Supplemental Figure 1. Representative images of ApoE, ApoJ and ApoA-I immunopositivity in subpial astrocytes and pyramidal neurons. Detection of ApoE (A, D), ApoJ (B,E) and ApoA-I (C,F) were found in subpial astrocytes cytoplasm (A-C) and pyramidal neurons cytoplasm (D-F). 400x magnification.



		ApoE				ApoJ				ApoA-I			
		CAA Type I	CAA Type II	No CAA/ Aβ dep.	controls	CAA Type I	CAA Type II	No CAA/ Aβ dep.	control s	CAA Type I	CAA Type II	No CAA/ Aβ dep.	controls
Capillary staining	0	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/6 (17%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
	1	0/6 (0%)	5/8 (63%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/6 (0%)	5/8 (63%)	3/3 (100%)	2/3 (67%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)
	2	1/6 (17%)	3/8 (37%)	3/3 (100%)	2/3 (67%)	0/6 (0%)	3/8 (37%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	1/8 (13%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)
	3	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/6 (0%)	7/8 (87%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)
	4	5/6 (83%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	6/6 (100%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	5/6 (83%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
p value between groups		0.002				0.001				0.006			
p value CAA I vs CAAII		0.004				0.002				0.003			
p value CAA yes/no		0.066				0.033				0.145			
Meningeal arteries	0	0/6 (0%)	0/8 (0%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	0/8(0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	2/6 (33%)	2/8 (25%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)
	1	1/6 (17%)	2/8 (25%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	0/6 (0%)	0/8(0%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/6 (33%)	3/8 (37%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)
	2	1/6 (17%)	2/8 (25%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	1/6 (17%)	1/8 (12%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/6 (17%)	2/8 (25%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
	3	4/6 (67%)	4/8 (50%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	5/6 (83%)	7/8 (87%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/6 (17%)	1/8 (13%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
p value between groups		0.307				0.448				0.905			
p value CAA I vs CAAII		0.823				0.825				0.969			
p value CAA yes/no		0.168				0.057				0.406			
Cortical arteries	0	1/6 (17%)	2/8 (25%)	3/3 (100%)	1/3 (33%)	0/6 (0%)	2/8 (25%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	3/6 (50%)	4/8 (50%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)
	1	0/6 (0%)	1/8 (13%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	0/6 (0%)	1/8 (13%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)
	2	2/6 (33%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/6 (0%)	1/8 (13%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	3/6 (50%)	3/8 (37%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
	3	3/6 (50%)	5/8 (63%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	6/6 (100%)	5/8 (63%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	0/8(0%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)
p value between groups		0.114				0.048				0.441			
p value CAA I vs CAAII		0.305				0.239				0.646			
p value CAA yes/no		0.099				0.018				0.105			
Neuritic plaques	0	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)	4/6 (67%)	4/8 (50%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)
	1	3/6 (50%)	3/8 (37%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	3/6 (50%)	3/8 (38%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	2/6 (33%)	4/8 (50%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
	2	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/6 (17%)	0/8 (0%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
	3	3/6 (50%)	5/8 (63%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	2/6 (33%)	5/8 (63%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
p value between groups		0.002				0.002				0.490			
p value CAA I vs CAAII		0.640				0.360				0.533			
Diffuse plaques	0	0/6 (0%)	0/8 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/6 (0%)	0/8(0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	3/6 (50%)	4/8 (50%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)
	1	1/6 (17%)	2/8 (25%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)	3/6 (50%)	2/8 (25%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	1/6 (17%)	4/8 (50%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
	2	2/6 (33%)	1/8 (13%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	1/6 (17%)	1/8 (13%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/6 (33%)	0/8(0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
	3	3/6 (50%)	5/8 (63%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	2/6 (33%)	5/8 (63%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)	0/8(0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
p value between groups		0.389				0.017				0.234			
p value CAA I vs CAAII		0.638				0.542				0.155			

Supplemental Table 2. ApoE, ApoJ and ApoA-I immunodetection in the different subgroups. Statistical differences were calculated using the Chi Square (χ^2) test.

Artículo 2

Association of CD2AP neuronal deposits with Braak stage in Alzheimer's disease

J. Camacho, A. Rábano, P. Marazuela, A. Bonaterra-Pastra, T. Moliné, S. Ramón y Cajal, E. Martínez-Sáez y M. Hernández-Guillamon

Enviado el 8 de marzo de 2021 a Brain Pathology.

Association of CD2AP neuronal deposits with Braak stage in Alzheimer's disease

Jessica Camacho^{1,2}, Alberto Rábano³, Paula Marazuela⁴, Anna Bonaterra-Pastra⁴, Teresa Moliné¹, Santiago Ramón y Cajal^{1,2}, Elena Martínez-Sáez^{1,2*} and Mar Hernández-Guillamon^{4*}.

¹ Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

² Morphological Science Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

³ Neuropathology Department, CIEN Foundation, Alzheimer's Centre Queen Sofía Foundation, Madrid, Spain.

⁴ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Declarations

Availability of data and material

The data that support the findings of this study are available upon request

Acknowledgments and Funding Sources

The authors are indebted to the donors and their families for their generous contributions. This work was funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI17/00275, PI20/00465], co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). The Neurovascular Research Laboratory is part of the *INVICTUS+* network, ISCIII, Spain [RD16/0019/0021]. M.H.-G. is supported by the Miguel Servet Programme, ISCIII, Spain [CPII17/00010].

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval statement

The study was approved by the Ethical Committee of Vall d'Hebron University Hospital (PR (IR) 173/2019).

Patient consent statement

Patients included in this study, or their relatives, expressed their willingness to donate brain tissue for research purposes and were donors to the Neurological Tissue Bank of the HUVH or to the CIEN Foundation Brain Bank. Written informed consent was obtained from all participants.

Permission to reproduce material from other sources

No material from other sources has been used in this study

Clinical trial registration: Not applicable

Authors details

Jessica Camacho

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8018-8274>

jcamacho@vhebron.net

Alberto Rábano

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9320-6566>

arabano@fundacioncien.es

Paula Marazuela

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1038-5242>

marazuela.paula@gmail.com

Anna Bonaterra-Pastra

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1480-622X>

annabonatererra95@gmail.com

Teresa Moliné

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-4912-5114>

teresa.moline@vhir.org

Santiago Ramón y Cajal

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3867-1390>

sramon@vhebron.net

***Correspondence:**

Dr. Mar Hernández-Guillamon

Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Pg. Vall d'Hebron, 119-129
Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035, Barcelona, Spain.

Phone N: +34934894029 Fax N: +34934894015

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8844-0091>

Mar.hernandez.guillamon@vhir.org / marguillamon@gmail.com

Dr. Elena Martínez-Sáez

Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona.

119-129, Pg. Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain

Phone N: +34932746809 Fax N +34932746818

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6004-5364>

eamartinez@vhebron.net

Keywords: Alzheimer's Disease, CD2AP, Tau, Tauopathies, Pick's Disease, Neurofibrillary tangles.

Abstract

Genome-wide association studies have described several genes as genetic susceptibility loci for Alzheimer's disease (AD). Among them, *CD2AP* encodes CD2-associated protein, a scaffold protein implicated in dynamic actin remodeling and membrane trafficking during endocytosis and cytokinesis. Although a clear link between CD2AP defects and glomerular pathology has been described, little is known about the function of CD2AP in the brain. The aim of this study was to analyze the distribution of CD2AP in the AD brain and its potential associations with tau aggregation and β -amyloid (A β) deposition. First, we performed immunohistochemical analysis of CD2AP expression in brain tissue from AD patients and controls (N=60). Our results showed granular CD2AP immunoreactivity in the human brain endothelium in all samples. In AD cases, no CD2AP was found to be associated with A β deposits in vessels or parenchymal plaques. CD2AP neuronal inclusions similar to neurofibrillary tangles (NFT) and neuropil thread-like deposits were found only in AD samples. Moreover, immunofluorescence analysis revealed that CD2AP colocalized with pTau. Regarding CD2AP neuronal distribution, a hierarchical progression from the entorhinal to the temporal and occipital cortex was detected. We found that CD2AP immunodetection in neurons was strongly and positively associated with Braak stage, independent of age and other pathological hallmarks. To further investigate the association between pTau and CD2AP, we included samples from cases of primary tauopathies (corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP) and Pick's disease (PiD)) in our study. Among these cases, CD2AP positivity was only found in PiD samples as neurofibrillary tangle-like and Pick body-like deposits, whereas no neuronal CD2AP deposits were detected in PSP or CBD samples. No glial CD2AP deposits were observed in any group. In conclusion, our findings open a new road to investigate the complex cellular mechanism underlying the tangle conformation and tau pathology in the brain.

Introduction

More than 50 million people live with dementia worldwide, and it is estimated that this figure will reach 152 million by 2050⁷⁰. Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and is characterized by impairment of learning and memory. Neuropathologically, the intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau protein (pTau) as neurofibrillary tangles (NFT) and neuropil threads, together with the extracellular accumulation of amyloid- β (A β) in the core of the neuritic plaque, are considered the molecular and morphological signatures of AD^{5,26}. Currently, the NIA-AA criteria, which include the Thal phase, Braak stage and CERAD criteria, are used for the neuropathological diagnosis of AD²⁶. While the Thal phase⁶⁰ and CERAD criteria⁴⁰ apply to the presence and distribution of A β deposits, the Braak stage¹¹ refers to the hierarchical progression of neurofibrillary tau pathology (NFP).

AD belongs to the group of tauopathies, which are diseases characterized by abnormal aggregation of the microtubule-associated protein tau (MAPT) in neurons and/or glial cells⁵⁶. In neurons, tau plays an essential role in stabilizing microtubules, but it is also implicated in other cellular functions, such as signal transduction, interaction with the actin cytoskeleton, neuronal activity and synaptic plasticity⁶⁸. Tauopathies are classified according to the predominant tau isoform pattern. There are six known isoforms of tau protein expressed in the adult human brain. There are equal amounts of tau isoforms with three or four repetitive (3R or 4R) domains in the normal brain, while the ratio is altered in neurodegeneration^{31, 56}. For example, AD belongs to Class I (tau lesions contain equal amounts of 3R and 4R isoforms), progressive supranuclear palsy (PSP) and corticobasal degeneration (CBD) belong to Class II (tau lesions mainly composed of 4R isoforms) and, finally, Pick's Disease (PiD) belongs to Class III (tau lesions mainly composed of 3R isoforms)⁵⁶. While AD only shows pTau inclusions in neurons^{10, 31}, other tauopathies, such as PiD, PSP and CBD, display both neuronal and extensive glial pTau inclusions³¹. From a clinical point of view, these diseases can present as frontotemporal dementias or parkinsonisms⁵⁶.

Although still under debate, different evidences support the idea that A β deposition is a major event in AD pathogenesis, inducing or intensifying the generation of NFT, neuronal loss, vascular damage and neuroinflammation⁴⁹.

The A β peptide is the product of the processing of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretases, which gives rise mainly to the A β 40 and A β 42 peptides. Some of the evidence supporting the “amyloid cascade hypothesis” is the early occurrence of pathology in individuals carrying autosomal-dominant mutations in genes encoding APP or the γ -secretase complex proteins presenilin 1/2 (PSEN1/2) and a high AD prevalence in individuals with Down syndrome, an event attributed to the triplication and overexpression of the APP gene located on chromosome 21⁴⁹. However, A β aggregation and accumulation correlate poorly with cognitive symptoms and neurodegeneration^{7, 29, 37, 42}. The assessment of amyloid and tau by PET imaging suggests that the rate of amyloid deposition predicts the onset of tau accumulation, while the degree of tau deposition is related to cognitive impairment^{8, 23}. Indeed, different studies have shown that cognitive decline in AD starts when tau spreads from the entorhinal cortex into the neocortex^{46, 47}, and the stage of tau pathology strongly correlates with the progression of cognitive impairment^{37, 42, 69}. Taken together, these findings suggest that neurodegeneration and cognitive impairment in AD might be driven by the onset and spread of tau pathology.

Through genome-wide association studies (GWAS), different susceptibility loci have been identified for AD, including variants in the *CD2AP* gene^{14, 22, 25, 32, 33, 67}, which encodes the CD2-associated protein (CD2AP). CD2AP is a scaffold protein that controls actin dynamics and is expressed in neurons²⁴ and endothelial cells of blood-brain vessels^{34, 35, 66}. A link between defects in CD2AP and glomerular pathology has been described²⁰; however, little is known about the function of CD2AP in the brain. In particular, beyond the association of several *CD2AP* polymorphisms with AD risk in both early-onset (rs9473117⁷¹ and rs9381563⁵⁸) and late-onset AD (rs9349407^{25, 41, 54}, rs10948363^{9, 13, 33}, rs9296559^{25, 59} and rs9349407¹²) the precise role of the CD2AP protein in this disease is still undiscovered. In this regard, the main goal of the present study was to analyze CD2AP distribution in the AD brain and the potential association of CD2AP with tau aggregation, A β deposition and localization in AD as well as in other tauopathies.

Material and Methods

Selection of patients

Brain tissue samples were obtained from 81 autopsies carried out at the Pathology Department of Vall d'Hebron University Hospital (HUVH, Barcelona) (Cohort A) and the Center for Research in Neurological Diseases (CIEN Foundation, Madrid) (Cohort B). This series of patients included 45 with Alzheimer's neuropathological changes (\geq B1) and 21 with a tauopathy other than AD (7 cases of PiD, 9 cases of PSP and 5 cases of CBD); 15 cases without pTau deposition were included as control cases. All patient characteristics are presented in table 1. Patients included in this study, or their relatives, expressed their willingness to donate brain tissue for research purposes and were donors to the Neurological Tissue Bank of the HUVH or to the CIEN Foundation Brain Bank. The project was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain (PR (IR) 173/2019).

pTau and A β assessment in AD cases and controls

All samples were obtained 2 to 20 hours after death and fixed in 10% buffered formalin for 3-4 weeks. Macroscopic examination of the brain was then performed, and 27 cortical and subcortical areas, including the brainstem and cerebellum, were selected for routine histological diagnosis. The paraffin blocks were cut into 3 μ m sections and stained with hematoxylin and eosin. From each case, sections from the frontal, temporal, parietal, and occipital lobes and the hippocampus, amygdala, brain stem and cerebellum were analyzed by immunohistochemistry using a mouse anti-Amyloid- β antibody (Clone 6F/3D 1:500, Dako, Glostrup, Denmark) and a mouse anti-Tau antibody (Clone AT8 1:20, Thermo Scientific, Rockford, USA).

For the AD patients, when NFP was restricted to the transentorhinal area or extended into hippocampal and entorhinal regions, Braak stages I or II were assigned, respectively. Braak stage III was assigned when NFP was observed in temporal neocortical areas (occipitotemporal gyrus), and Braak stage IV was assigned when NFP extended to the middle temporal gyrus. Involvement of the superior temporal gyrus and the peristriate occipital region is characteristic of Braak stage V, and finally, the parastriate and striate areas are affected in Braak stage VI¹¹. Global AD pathology, including A β deposition, was evaluated and

staged according to the NIA-AA criteria²⁶. Accordingly, cases with Braak I or II stages were reclassified as B1, Braak III or IV as B2 and Braak V or VI as B3. A β deposits initially scored from 0 to 5 (Thal phases⁶⁰ were reclassified as A0 (Thal 0), A1 (Thal 1 or 2), A2 (Thal 3) or A3 (Thal 4 or 5). CERAD criteria A to C were transformed into C1 (CERAD A), C2 (CERAD B) or C3 (CERAD C)⁴⁰. The combination of these three grading systems gives an “ABC score” that indicates a low, intermediate or high probability that dementia was caused by AD changes or that there were no AD-related changes²⁶.

pTau and Tau-3R assessment in other tauopathies

Twenty-one cases of sporadic tauopathies other than AD were included in the study: 7 cases of PiD, 9 of PSP and 5 cases of CBD. PiD, PSP and CBD cases were diagnosed when characteristic pathological changes were found. PiD is a 3R tauopathy that can show AD-like pathology but spherical intracytoplasmic neuronal inclusions known as Pick bodies are its pathognomonic lesions. Thorn-shaped and ramified astrocytes and small globular oligodendroglial inclusions may be found. PSP and CBD are 4R tauopathies with different topographies and pathological changes, although some overlap in regional distribution may exist. PSP pathology is predominant in the hindbrain, and its characteristic findings include neuronal (globose tangles) and astrocytic pTau inclusions (tufted astrocytes). CBD pathology predominates in the forebrain and is characterized mainly by astrocytic pTau positivity (astrocytic plaques). PSP and CBD both exhibit pretangles in neurons and coiled bodies in oligodendroglial cells³¹.

In these cases, pTau immunohistochemistry was performed as described above (2.2). For the 3R-Tau assessment of PiD cases, 3 μ m sections from paraffin blocks of frontal and parietal cortex were stained with the mouse anti-3R-Tau antibody (Clone 8E6/C11, 1:100 Merck Millipore, Temecula, USA) using the Benchmark XT staining module with the ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems). Deparaffinization was carried out using the EZ PrepTM solution. The primary antibody was incubated for 1 hour at a 1/100 dilution and localized by a secondary antibody HRP Multimer containing a cocktail of HRP-labeled antibodies (mouse and rabbit antibodies to IgG and IgM). The resulting complex was then visualized using DAB Chromogen and finally counterstained with hematoxylin and Bluing Reagent. 3R-Tau immunoreactivity

was evaluated as the total number of positive neuronal inclusions and the presence or absence of positive neurites in 10 high-power fields in PiD cases (n=7).

2.4 CD2AP Immunohistochemistry

Four brain regions were selected to evaluate CD2AP immunostaining in AD and control cases: the anterior hippocampus, posterior hippocampus, temporal lobe and occipital lobe. In PiD, PSP and CBD cases, two brain regions were selected: the frontal and parietal lobes. Paraffin blocks of the selected areas were cut into 3 µm sections and stained with the mouse anti-CD2AP antibody (Clone HPA003326, 1:200, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) using the Benchmark XT staining module with the ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems). Deparaffinization was carried out using EZ Prep™ solution. The primary antibody was incubated for 40 minutes at a 1/200 dilution and localized by a secondary antibody HRP Multimer containing a cocktail of HRP-labeled antibodies (mouse and rabbit antibodies to IgG and IgM). The resulting complex was then visualized using DAB Chromogen and finally counterstained with Hematoxylin and Bluing Reagent. CD2AP expression was evaluated in vascular walls (meningeal and cortical arteries and capillaries), neurons, astrocytes, oligodendrocytes, endothelium and parenchymal deposits in all samples.

To study the possible association of neuronal CD2AP deposition with pTau protein, the 'B' score of the NIA-AA guidelines^{11, 26} was used to grade CD2AP deposits in AD and control cases. Thus, the score CD2AP-0 was given to cases without any CD2AP deposits, CD2AP-1 was given to cases with Braak Stage I-like (NFP of at least low density in the transentorhinal region) or Braak Stage II-like (NFP of at least moderate density in the outer layers of the entorhinal region and at least low density in the inner layers of the entorhinal region) CD2AP distribution, CD2AP-2 was given to cases with Braak Stage III-like (NFP of at least moderate density in the superficial and deep layers of the occipitotemporal gyrus, even in a small region of the occipitotemporal gyrus adjoining the transentorhinal region) or Braak Stage IV-like (NFP of at least moderate density in the superficial and/or deep layers of the middle temporal gyrus) CD2AP distribution, and finally CD2AP-3 was given to cases with Braak Stage V-like (NFP of at least moderate density in the superficial and deep layers of the

peristriate and often also the parastriate area) or Braak Stage VI-like (NFP of at least moderate density in layer V of the striate area) CD2AP distribution. In non-AD tauopathies, a qualitative evaluation was first performed, and specifically in PiD cases (n=7), a second quantitative assessment was performed. The number of positive neuronal inclusions and the presence or absence of positive neurites were determined in 10 high-power fields (hpf).

2.5 Immunofluorescence

The presence of CD2AP and pTau was evaluated by immunofluorescence in 3 µm-thick paraffin-embedded human brain slides. Brain sections were deparaffinized, hydrated and incubated with citrate buffer for 30 minutes at 95°C to improve antigen exposure. The sections were blocked for 1 hour at RT and incubated overnight with anti-Tau AT8 antibody (5 µg/ml, Thermo Fisher) and anti-CD2AP antibody (1 µg/ml, Sigma-Aldrich). After rinsing, the samples were incubated with Alexa Fluor-568 anti-mouse IgG and Alexa Fluor-488 anti-rabbit IgG secondary antibodies (Life Technologies) diluted 1:500 in blocking solution for 1 hour at room temperature. To reduce brain tissue autofluorescence, brain sections were then incubated with 0.3% Sudan Black B (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. Finally, samples were dehydrated and mounted on coverslips using Vectashield with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories). Double immunofluorescence images were captured with a Zeiss LSM980 confocal microscope.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using SPSS Statistics version 21 (IBM Corporation). The association of categorical variables was analyzed using contingency tables and a chi-squared test with the Pearson p-value. The distribution of age was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. When the data were normally distributed, variables were expressed as the mean \pm standard deviation (SD), and an ANOVA test with a Bonferroni correction for multivariate analysis was applied. When the data were not normally distributed, variables were expressed as the median [interquartile range], and a Mann-Whitney U test was applied. Univariate associations of the CD2AP score with categorical variables were also determined using contingency tables and a chi-squared test. In this case, the Pearson p-value was used for sex, whereas the Linear-by-Linear Association p-value was used for Thal phase, Braak stage, CERAD criteria and AD risk.

The association of the CD2AP score with the continuous variable age was tested by applying a Kruskal-Wallis test. Regression analysis of categorical data (CATREG) was performed using only the significant variables of the univariate analysis. The standardized coefficients beta with the corresponding estimate of standard error (SE) and p-value were obtained and displayed. A p-value below 0.05 was considered statistically significant.

Results

CD2AP immunopositivity in AD cases

The distribution of CD2AP immunoreactivity and its potential association with pTau and A β pathology were analyzed in cortical areas of postmortem AD brain samples from Cohort A. CD2AP neuronal deposits resembling neurofibrillary tangles and occasional tortuous fibers resembling neuropil threads were found in cases with AD pathology in regions showing pTau pathology, as depicted in consecutive sections of the entorhinal region in figure 1A and 1B. However, no CD2AP-positive dystrophic neurites were found (figure 1C-D). No vascular wall or parenchymal CD2AP deposits were identified in areas with parenchymal and vascular A β deposition (as shown in consecutive cortical levels in figure 1E-F and 1G-H). However, in all cases, mild granular endothelial CD2AP positivity was detected (figure 1B). To further study the association found, immunofluorescence double staining of CD2AP and Tau-AT8 was performed in AD cortical sections (figure 2). The results confirmed that CD2AP colocalized with pTau, as shown by cytoplasmic intraneuronal deposits in pyramidal neurons and occasional neuropil thread-like structures. No CD2AP immunoreactivity was found independent of pTau (figure 2A). At a higher magnification, this colocalization with pTau was shown to be incomplete, and CD2AP expression displayed a discontinuous granular pattern (figure 2B).

The next step was to confirm the association between pTau and CD2AP distribution in AD cases and controls. For this purpose, we enlarged the series of patients by adding a second cohort of AD and non-AD patients (cohort B, table 1). Cohorts A and B, including all cases (N=60), were selected according to Braak stage (table 2). No significant differences regarding age or sex were found between cohorts. Considering the two cohorts together, AD patients were significantly older than control patients (78.9 ± 10.8 vs 61.4 ± 10 , $p < 0.001$), but no

differences were found regarding sex. Braak stage evaluation with Thal phase and CERAD criteria allowed the assignment of “ABC scores” and an AD risk evaluation²⁶. The two cohorts were neuropathologically equivalent (no significant differences were found in the frequency of cases classified according to Thal phase, Braak stage or CERAD criteria). Based on these evaluations, 48.4% of total cases (29/60) fulfilled the criteria for intermediate (16/60) or high (13/60) levels of AD neuropathological changes (table 2).

Next, the CD2AP score was evaluated in AD and control cases. The results obtained from both cohorts (A and B) were comparable (table 2). As shown in figure 3A, CD2AP deposits were rated similarly to Braak stages: a score of CD2AP-0 was assigned to cases with no deposits, CD2AP-1 was assigned to cases with deposits in the transentorhinal and/or entorhinal region, CD2AP-2 was assigned when deposits extended to the occipitotemporal and/or medial temporal gyrus, and CD2AP-3 was assigned to cases with deposits that had spread to the peristriate, parastriate and/or striate area. As described before, neuronal CD2AP positivity closely resembled the neurofibrillary tangles identified with pTau. Interestingly, neuropil thread-like CD2AP positivity was significantly lower than pTau expression. The intensity of CD2AP neuronal immunostaining was homogenous, independent of AD risk, although when it expanded, it followed the pathological distribution of pTau. An example of Braak stages and CD2AP score is shown in figure 3B. After assessment, 41.7% of the cases did not show CD2AP deposits (25/60), 35% of the cases were graded as CD2AP-1 (21/60), 10% of the cases were rated as CD2AP-2 (6/60) and finally, 13.3% of the cases fulfilled criteria for CD2AP-3 score (8/60) (table 2).

Statistical univariate analyses revealed that CD2AP expression was significantly associated with age, Thal phase, Braak stage, CERAD criteria and AD risk ($p < 0.001$) (table 3). However, after regression analysis of the categorical data, only the association of CD2AP expression with Braak stage remained statistically significant ($p < 0.001$) (table 3). In this context, none of the control cases (B0) showed CD2AP deposition, whereas 33.33% of the B1 cases (5/15) were CD2AP-1 and 66.67% did not show any CD2AP immunoreactivity (10/15). All B2 and B3 cases presented CD2AP positivity: 93.33% of B2 cases (14/15) were graded as CD2AP-1, and 6.67% were graded as CD2AP-2 (1/15); and 13.33% of B3 cases were graded as CD2AP-1 (2/15), 33.33% were scored CD2AP-2

(5/15) and 53.33% of B3 cases (8/15) showed the highest expansion of CD2AP (CD2AP-3). This hierarchical progression of CD2AP distribution regarding Braak stage is represented in figure 4.

CD2AP immunopositivity in other tauopathies

To analyze whether the association between pTau and CD2AP occurs in other tauopathies beyond AD, CD2AP distribution was studied in 9 cases of PSP, 5 cases of CBD and 7 cases of PiD (table 1). The PSP and PiD patients were also significantly older than the control patients (PSP= 74.2 years \pm 9.1 and PiD= 75.1 years \pm 9.7 vs Controls= 61.4 years \pm 10, $p < 0.001$). No significant differences were found regarding sex (table 1).

The presence of CD2AP was evaluated in neurons and glial and oligodendroglial cells. Our results evidenced only some spherical neuronal CD2AP inclusions resembling Pick bodies and some NFT-like and neuropil thread-like inclusions in 6/7 PiD cases, while no CD2AP neuronal or glial inclusions were found in any PSP or CBD cases (figure 5). Remarkably, no pretangle-like neuronal granular positivity was detected. Given this suggestive association with Tau-3R-associated diseases, we then compared CD2AP and 3R-Tau expression in consecutive sections from PiD cases. The results showed that CD2AP neuronal positivity was significantly higher than that of 3R-Tau (40.7 \pm 26.3 CD2AP inclusions/10 hpf vs. 14.4 \pm 11.9/10 hpf 3R-Tau deposits, $p = 0.033$), with only CD2AP and not 3R-Tau detected in neurites (figure 6).

Discussion

Advances in human genetics have revealed different genetic variants involved in different neurological diseases. In particular, GWAS have identified common genetic variations at numerous loci associated with AD risk. Some of these are variants in genes involved in cholesterol transport (*ABCA7*, *APOE4* and *INPP5D*), others are linked to the clearance of nonnative proteins by immune cells (*TREM2* and *CLU*), and others are related to endocytic and lysosomal transport (*BIN1*, *CD2AP*, *PICALM*, *RIN3*, *SORL1*, *GRN* and *PLD3*)^{14, 20, 32, 33, 67}. Although the association of different CD2AP genetic variants with AD risk has been well documented in multiple cohorts^{14, 20, 25, 32, 33, 67}, the role of the

expression of the CD2AP protein in this pathogenesis is still unclear. To determine how CD2AP contributes to AD, we studied its distribution in brain tissue from AD patients and controls in a multicenter study with the participation of two Spanish biobank centers.

CD2AP is a multidomain scaffolding protein implicated in multiple physiological and disease processes. It was first described as a protein involved in T-cell activation that stabilizes the interaction between T cells and antigen-presenting cells¹⁷. CD2AP contains a coiled coil domain and three Src homology 3 (SH3) domains that serve as attachment sites for other proteins⁵² and facilitate its role in dynamic actin remodeling and membrane trafficking during endocytosis and cytokinesis¹⁵. CD2AP is primarily expressed in glomerular podocytes, which compose the protein filtration barrier of the kidney. Its critical role in renal function was confirmed, as mice lacking *CD2AP* developed congenital nephrotic syndrome⁵² due to its role in a specialized junction known as a slit diaphragm⁵³. Moreover, human *CD2AP* mutations in which the product is a truncated CD2AP protein have been linked to nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis in children^{18, 20, 38}. Although one of these mutations was identified in a young adult with focal segmental glomerulosclerosis and mild dementia⁶³, the long-term neurological consequences of CD2AP haploinsufficiency in adults carrying CD2AP mutations have not been described thus far. CD2AP immunostaining studies in mice showed the expression of this protein mostly in epithelial cells but also in the endothelium of different organs, including the central nervous system^{34, 35}. Indeed, in the brain, a more recent study in rodents also detected CD2AP protein in Purkinje cells of cerebellum and in cortical neurons²⁴. Thus, CD2AP in the brain has been linked to synapse function through its involvement in vesicle trafficking^{12, 30, 33}, axonal sprouting²⁴ and maintenance of the blood-brain barrier⁴³.

In our study, we confirmed granular immunopositivity for CD2AP in the human brain endothelium. However, our most interesting finding was the presence of CD2AP-immunoreactive neuronal inclusions similar to neurofibrillary tangles in the hippocampus and temporal and occipital cortex of AD brains. In this pathological context, CD2AP has previously been linked with A β metabolism and clearance. Downregulation of CD2AP in neuroblastoma cells decreased extracellular A β levels³⁶. Additionally, CD2AP was implicated in APP trafficking

and processing⁶⁴, and its overexpression induced decreased levels of APP in neurons by accelerating the lysosome-dependent degradation of APP¹⁹. In contrast to the in vitro effects of CD2AP on A β production and release, CD2AP loss of function did not affect total A β levels or amyloid plaque burden in an AD mouse model in vivo³⁶. In AD patients, the possible role of CD2AP in β -amyloidosis is reinforced by data showing that the *CD2AP* variants rs9349407⁵⁴ and rs10948363⁹ are associated with a greater load of neuritic plaques. However, in our AD cohort, brain CD2AP immunodetection was not associated with vascular or parenchymal A β deposits. In contrast, the protein was specifically present in regions with an evident presence of NFT. Indeed, we confirmed by immunofluorescence that CD2AP colocalized at an intraneuronal level with pTau protein in the AD brain.

Based on this result, we next analyzed the expression of CD2AP in a cohort of brains from two different centers that were selected according to Braak stage¹¹. First, we found that none of the control samples showed intraneuronal CD2AP deposits. In contrast, in the AD samples, immunodetection of CD2AP in neurons was strongly and positively associated with Braak stage, independent of age and other pathological hallmarks. In fact, although CD2AP expression was significantly linked with AD risk in the univariate analysis, the results from the logistic regression confirmed that this association was attributable to the strong association of CD2AP expression with Braak stage. Our observations suggest that the alteration in CD2AP accumulation is directly linked to tau pathology following a hierarchical progression in the studied areas (hippocampus, temporal cortex and occipital cortex). Remarkably, CD2AP positivity was never found beyond pTau deposition, suggesting that the appearance of CD2AP neuronal deposits would follow a slower progression than pTau in AD.

Different studies have already proposed that CD2AP regulation might be related to tau toxicity and neuronal apoptosis. For example, the loss of the fly ortholog of CD2AP, *Cindr*, exacerbated tau-mediated toxicity in a *Drosophila* model⁵⁵ and was required for neuronal homeostasis and synaptic function in this model⁴⁴. These studies suggest that enhanced expression of CD2AP may be protective against AD. Nonetheless, the authors of the latter study described ubiquitous expression of *Cindr* in glial cells and neurons, with a particular enrichment at presynaptic terminals⁴⁴. As this expression pattern clearly differs from the

distribution that we found in human tissue, which was restricted to endothelial cells, isolated neurites and NFT-like neuronal inclusions, the function of *Cindr* in *Drosophila* may not be exactly comparable to the function of the protein in the pathological human brain. Indeed, in humans, previous reports have also suggested a link between CD2AP and tau pathology, as *CD2AP* was detected as a susceptibility locus for cerebrospinal fluid (CSF) tau biomarkers⁴⁸, and the *CD2AP* rs9381563 variant was associated with altered pTau levels in the CSF⁵⁸. Moreover, *CD2AP* rs10948363 showed a suggestive association with NFT¹³. To our knowledge, the association between CD2AP protein expression load in patients carrying these *CD2AP* genetic variants has not been specifically determined. However, the results from available datasets from the Genotype-Tissue Expression Project, which describes genetic effects on gene expression levels²² show that *CD2AP* risk alleles are associated with increased gene expression in various tissues, including the brain. These observations, together with our results showing negligible levels of neuronal CD2AP expression in cases with lower Braak stages and higher presence of CD2AP neuronal accumulation in cases with a higher Braak stage and AD score risk, may open the possibility that increased CD2AP expression enhances the toxicity of pTau pathology in AD, in contrast to the previous hypothesis^{44, 55, 59}. However, the total or soluble levels of CD2AP expression have not been extensively analyzed or previously described. A prior report showed that CD2AP gene expression was decreased in peripheral blood lymphocytes from sporadic AD cases⁵⁹, although expression in postmortem human tissue samples should be determined through different analytical techniques to underscore the implication of CD2AP in tau pathology progression. Other proteins encoded by genes identified as presenting variants associated with AD as well as those with endocytic cellular functions have also been associated with tau pathology. This is the case, for instance, for PICALM, whose levels were decreased in AD brains and colocalized with NFT¹. The authors of these studies showed that abnormal PICALM processing was linked to an impairment of autophagy in AD and in tauopathies without A β pathology, such as CBD and PiD². Furthermore, in postmortem brains of familial cases of frontotemporal lobar degeneration with tau-immunoreactive inclusions (FTLD-tau), soluble PICALM protein levels were reduced compared to nondemented control brains, while PICALM detected in the insoluble brain fraction was

significantly increased³. Interestingly, in a murine tauopathy model, PICALM haploinsufficiency induced exacerbated tau pathology via autophagy deregulation³. Overall, the balance between soluble protein levels and insoluble/protein inclusions of tau-associated proteins seems to be a critical factor influencing the toxicity of NFT and should also be considered in the case of CD2AP in future studies. Indeed, autophagic-endolysosomal networks perform important functions in tau accumulation, including the clearance of neurotoxic forms of tau and pTau at specific sites through the ubiquitin-proteasome system (UPS). Dysregulation of these autophagic-endolysosomal processes has been shown in different tauopathies²⁸. In this regard, CD2AP binds ubiquitin⁴⁵ and is also proposed to regulate UPS function in synaptic transmission⁴⁴.

Because of the observed link between CD2AP and pTau pathology, the expression of the CD2AP protein in the brain of patients with other tauopathies was also analyzed. Our results showed that only PiD presented CD2AP deposits resembling Pick bodies in the cytoplasm of neurons. To date, there are no reports linking PiD to CD2AP or to other tauopathies. PiD is a dementia in which tau lesions are mainly composed of the 3R isoforms, while pTau lesions in AD are composed of equal amounts of 3R and 4R isoforms^{31,56}. Since CD2AP neuronal immunoreactivity was not observed in coiled bodies, tufted astrocytes of PSP cases, astrocytic plaques or in NFTs of CBD cases, we next analyzed whether a 3R-Tau isoform might specifically interact with CD2AP. However, CD2AP was not only associated with 3R-Tau immunoreactivity, as 3R-Tau neuronal deposits were outnumbered by CD2AP neuronal deposits, and CD2AP-positive neurites were found in the absence of neuritic 3R-Tau deposits. Different processing and posttranslational modifications could explain this disease-specific association between CD2AP and pTau. Arakhamia et al.⁴ compared posttranslationally modified tau filaments in AD and CBD and found striking differences in the processes of misfolding and self-assembly into fibrils. In fact, different electrophoretic migration patterns of tau deposits have been found in CBD or PSP⁵¹ and PiD¹⁶ compared to the paired helical filaments found in AD. The ultrastructural characteristics of tau filaments in these tauopathies were also studied⁶, revealing differences in shape, size and conformation. The traits of the AD paired helical filaments may be at the origin of this specific association between pTau and CD2AP. Another explanation for this disease-specific

association could be the age of the tangle, as in AD, there is a shift from 4R in the pretangle to 3R in the ghost tangle⁶⁵. Our results suggest that the presence of CD2AP neuronal inclusions could be related to a more mature or advanced NFT structure.

Our study has some limitations that should be considered. Only immunohistochemical and immunofluorescence studies were performed, whereas biochemical analysis to determine the total gene and protein expression of CD2AP levels in the brain, as well as in blood and CSF, would have been extremely insightful. Despite the effort of collecting multicenter cohorts, obtaining a significant sample size for AD cases, it was not possible to do so for some infrequent diseases (PSP, CDB and PiD). The small sample size of these groups was a limitation for statistical analysis, allowing mainly qualitative and descriptive results. Furthermore, in those cases, only frontal and parietal areas could be collected, although the dentate gyrus would have been an interesting region to study. Extending the analysis to tau-independent neurodegenerative diseases characterized by aggregation of alpha-synuclein (Lewy body diseases, multisystem atrophy) or TDP43 (amyotrophic lateral sclerosis, FTLD-TDP43) could expand the possible role of CD2AP in neurodegeneration. Finally, because the *APOE* genotype is linked to A β brain accumulation^{50, 62} but is also a risk factor for tau neurodegeneration independent of A β ^{61,73}, future studies analyzing the effect of *APOE* on CD2AP neuronal deposition in tauopathies are required.

In conclusion, our immunohistochemical study showed an association of CD2AP with pTau inclusions in AD and PiD but not in CDB or PSP. This descriptive analysis cannot establish a causative relationship between CD2AP neuronal deposits and AD risk. More functional studies are needed to elucidate the implication of the increase in CD2AP expression or its accumulation in neurons in AD. Nevertheless, determining its role in pathological conditions seems relevant to elucidate the molecular events involved in the formation of NFT. We are facing an opportunity to offer future perspectives for the diagnosis or treatment of tauopathies. In this regard, analyzing experimentally the outcome of treatment with CD2AP modulators, some of them previously tested for focal segmental glomerulosclerosis^{57, 63}, appears to be a promising strategy to determine the potential modulation of NFT conformation and toxicity in AD and PiD. In addition, because CSF biomarkers based on the detection of total tau and

pTau have demonstrated clinical utility in AD diagnosis^{27, 39}; our hypothesis is that the combination of these established markers with CD2AP levels in CSF might be tested as markers for AD risk and contribute to the differential diagnosis of tauopathies.

Tables

Cohort	Alzheimer's Disease			Control			PSP	CBD	PiD	p
	A	B	Total	A	B	Total	B	B	B	
N	17	28	45	6	9	15	9	5	7	
Age	77.8 ± 8.3	79.6 ± 12.2	78.9 ± 10.8 ***	59.2 ± 12.4	62.9 ± 8.6	61.4 ± 10.0	74.2 ± 9.1 *	72.4 ± 8.6	75.1 ± 9.7 *	< 0.001
Sex (females)	10 (58.8%)	18 (64.3%)	28 (62.2%)	2 (33.3%)	5 (55.6%)	7 (46.7%)	4 (44.4%)	2 (40.0%)	3 (42.9%)	0.580

Table 1: Demographic characteristics of Cohort A (Vall d'Hebron University Hospital), Cohort B (CIEN Foundation) and the compilation of the two cohorts (total cohort). Statistical differences were analyzed among total cohorts between disease groups. Bold numbers indicate statistically significant differences. *** p<0.001 vs. the control group, * p<0.05 vs. the control group

	Cohort A	Cohort B	p-value	Total
N	23	37		60
Age	78 [63–82]	80 [64–86.5]	0.373	78.5 [63.5–85]
Sex (females)	12 (52.2%)	23 (62.2%)	0.445	35 (58.3%)
Thal phase			0.150	
A0	9 (39.1%)	12 (32.4%)		21 (35%)
A1	2 (8.7%)	5 (13.5%)		7 (11.7%)
A2	7 (30.4%)	4 (10.8%)		11 (18.3%)
A3	5 (21.7%)	16 (43.2%)		21 (35.0%)
Braak stage			0.976	
B0	6 (26.1%)	9 (24.3%)		15 (25%)
B1	6 (26.1%)	9 (24.3%)		15 (25%)
B2	6 (26.1%)	9 (24.3%)		15 (25%)
B3	5 (21.7%)	10 (27.0%)		15 (25%)
CERAD criteria			0.131	
C0	9 (39.1%)	19 (51.4%)		28 (46.7%)
C1	6 (26.1%)	2 (5.4%)		8 (13.3%)
C2	3 (13.0%)	4 (10.8%)		7 (11.7%)
C3	5 (21.7%)	12 (32.4%)		17 (28.3%)
AD risk			0.563	
Nonrelated	10 (43.5%)	12 (32.4%)		22 (36.7%)
Low	3 (13.0%)	6 (16.2%)		9 (15.0%)
Moderate	7 (30.4%)	9 (24.3%)		16 (26.7%)
High	3 (13.0%)	10 (27.0%)		13 (21.7%)
CD2AP			0.421	
0	10 (43.5%)	15 (40.5%)		25 (41.7%)
1	9 (39.1%)	12 (32.4%)		21 (35.0%)
2	3 (13.0%)	3 (8.1%)		6 (10.0%)
3	1 (4.3%)	7 (18.9%)		8 (13.3%)

Table 2. Demographic and pathological description of Alzheimer’s disease (AD) cases and controls from Cohort A (Vall d’Hebron University Hospital) and Cohort B (CIEN Foundation). The expression of CD2AP was classified according to the score described in section 2.4 of the Materials and Methods and schematically represented in figure 3A. Statistical differences were analyzed among cohorts for the different variables.

CD2AP ASSOCIATION	Univariate analysis p-value	CATREG Regression	
		Beta ± SE	p-value
Age	< 0.001	-0.097 ± 0.081	0.237
Sex (Female)	0.680	---	---
Thal Phase	< 0.001	0.190 ± 0.374	0.773
Braak Stage	< 0.001	0.495 ± 0.230	0.006
CERAD Criteria	< 0.001	0.045 ± 0.167	0.790
AD Risk	< 0.001	0.334 ± 0.436	0.561

Table 3. CD2AP score associations with demographic and pathological characteristics in AD patients and controls of both cohorts. Categorical regression (CATREG) was assessed using only the significant variables of the univariate analysis. Beta ± SE: standardized coefficients beta with the corresponding estimate of standard error. Bold numbers indicate statistically significant differences.

Figures

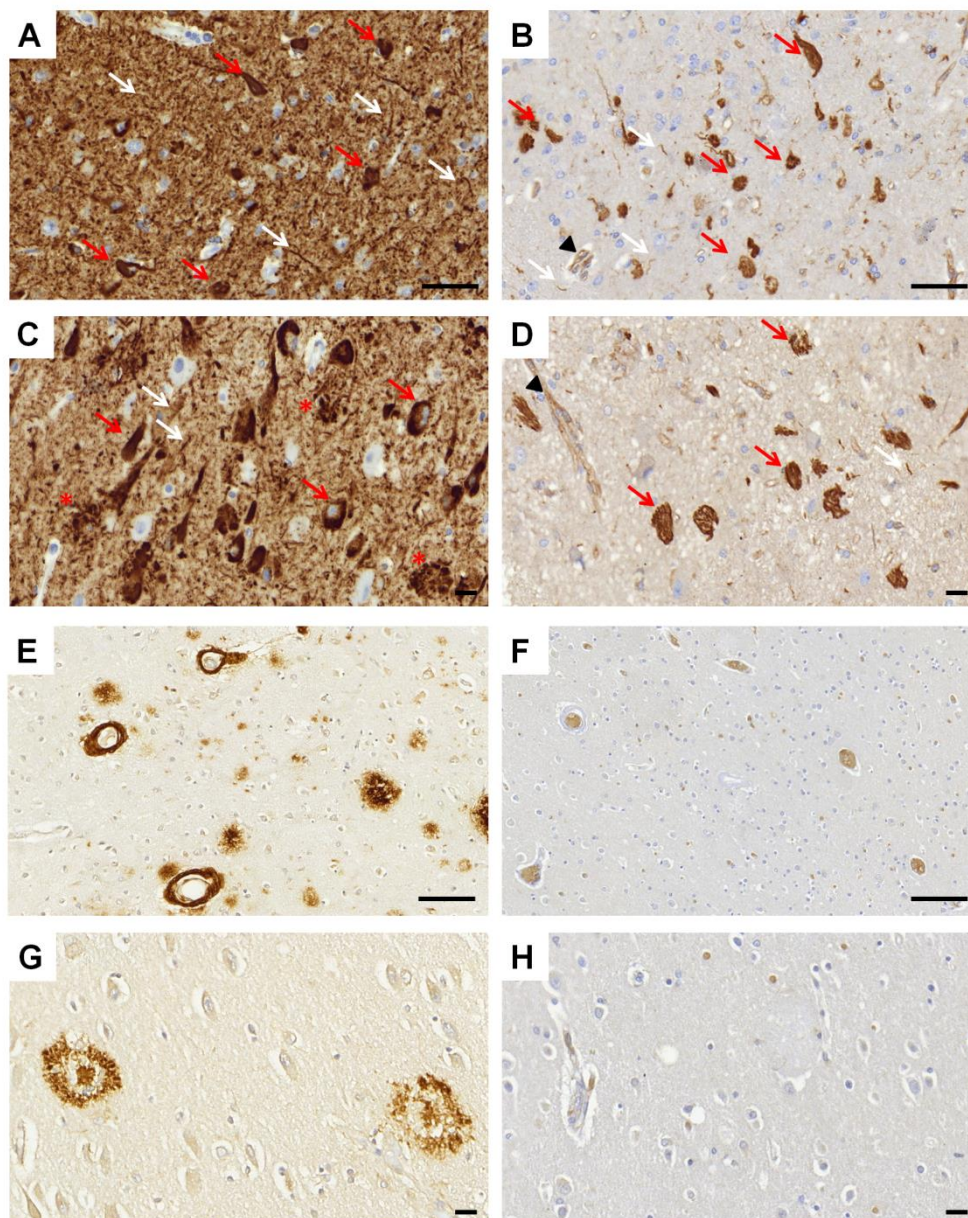


Figure 1. Representative images of consecutive sections from AD brains (A-B, C-D, E-F and G-H). **A, C.** Tau-AT8 was detected in neurofibrillary tangles in pyramidal neurons and neuropil threads in dendrites (red and white arrows, respectively) and dystrophic neurites (asterisks). **B, D.** CD2AP-positive inclusions were present in pyramidal neurons (red arrows) and occasional neuropil thread-like deposits (white arrows), and granular CD2AP positivity was detected in endothelial cells (arrowhead). No dystrophic neurites or neuritic plaques were stained with CD2AP. **E, G.** A β immunostaining demonstrated parenchymal and vascular deposits. **F, H.** CD2AP immunohistochemistry showed no parenchymal or vascular positivity in those areas. Only blood and endothelial cells were

positive for CD2AP. C, D, G and H: Scale bars = 20 μm . A, B, E and F: Scale bars = 50 μm .

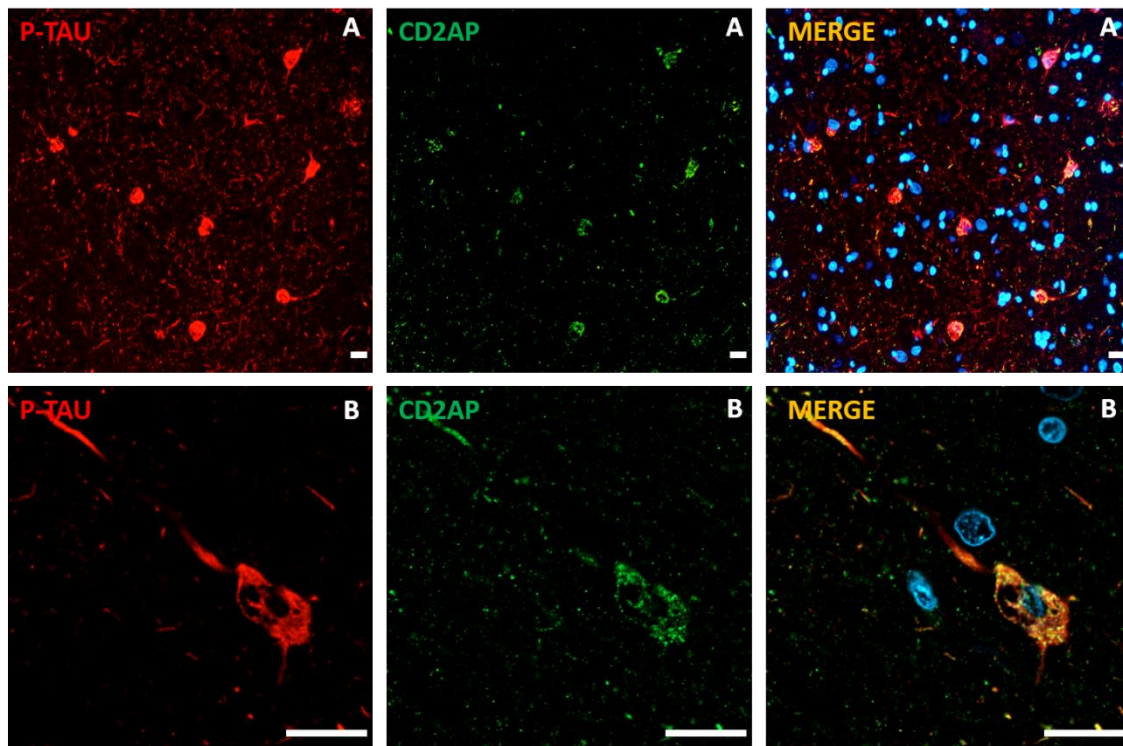


Figure 2: Confocal evaluation of CD2AP and Tau-AT8 distribution in cortical brain sections from AD patients. Representative confocal images showing the colocalization of pTau (red) and CD2AP (green) in the neuronal cytoplasm and neuropil threads in the case of the B3 and CD2AP-3 scores. Merged images show the colocalization of pTau and CD2AP (yellow). Scale bar = 10 μm .

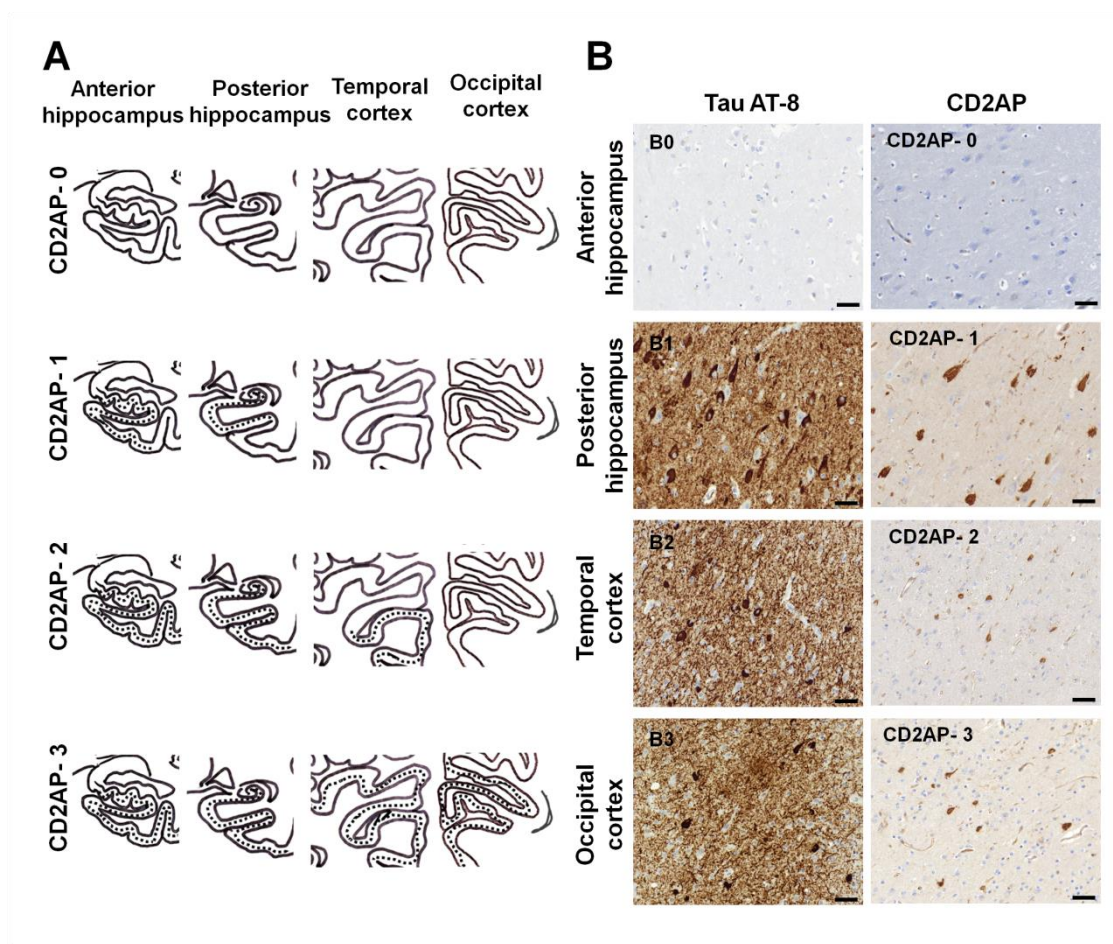


Figure 3. **A.** Schematic representation of the CD2AP score established according to the positivity of CD2AP in neurons at different areas studied for the Braak stage assessment. **B.** Representative images of consecutive sections stained with anti-Tau-AT8 and anti-CD2AP in different brain areas. Scale bars = 50 μ m.

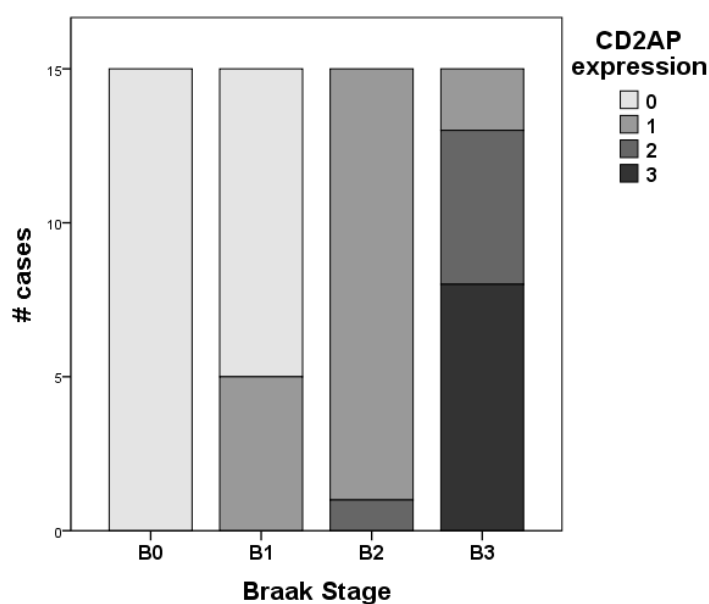


Figure 4. Bar diagram depicting the CD2AP score according to pTau Braak stage.

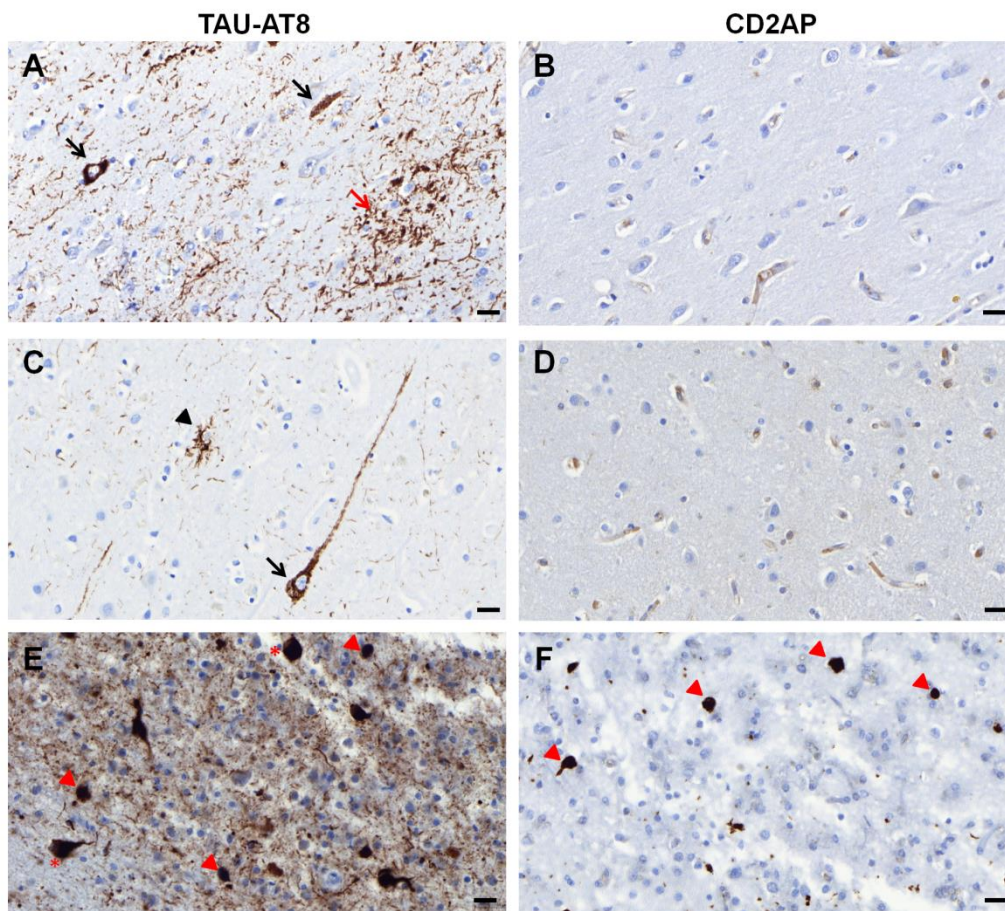


Figure 5. Representative images of consecutive sections from different tauopathies: CBD (A-B), PSP (C-D) and PiD (E-F). **A, C and E.** Tau AT-8 immunostaining showed diffuse granular cytoplasmic immunoreactivity (pretangle, black arrow) and spherical inclusions (red arrow) in neurons in the CBD (A), tufted astrocytes (black arrowhead) and pretangles (black arrow) in PSP samples (C) and neurofibrillary tangles (asterisk) and Pick bodies (red arrowheads) in PiD samples (E). **B, D and F.** CD2AP immunohistochemistry failed to show any neuronal or glial positivity in CBD or PSP samples (B, D), whereas CD2AP-positive Pick body-like spherical inclusions (red arrowheads) were observed in PiD samples (F). A-F: Scale bars = 20 μ m.

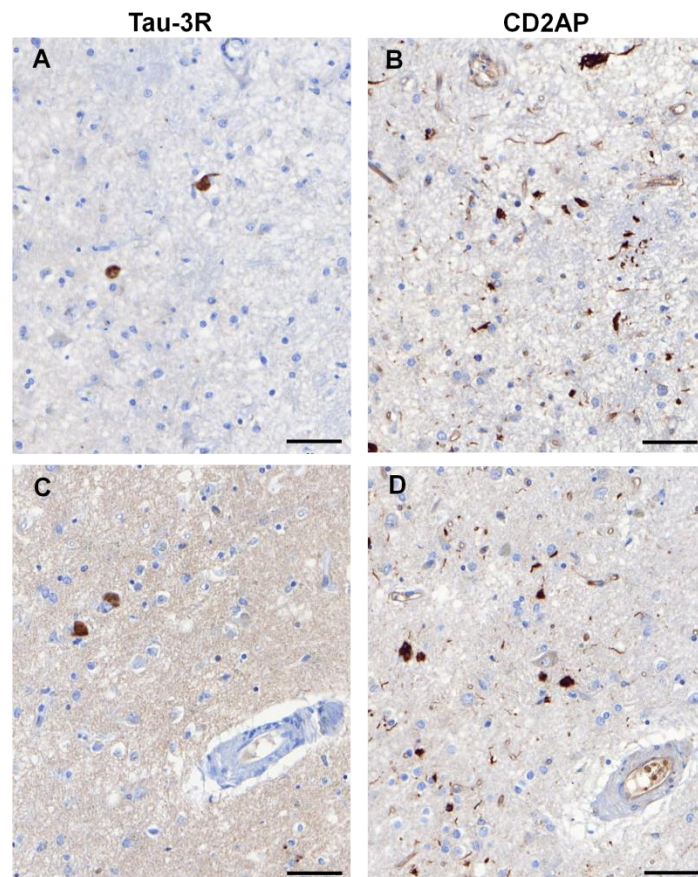


Figure 6: Representative images of consecutive sections from PiD brain samples (A-B and C-D). A, C. Tau-3R positivity was restricted to isolated neuronal deposits, with no neuropil thread immunoreactivity. B, D. CD2AP immunostaining showed neuronal inclusions and neuropil thread-like inclusions. Scale bars = 50 μm .

Author contributions

MHG and EMS designed and coordinated the study. JC participated in the design of the study. SR and AR advised on the theoretical aspects of the study. TM performed the immunohistochemistry, and PMF performed the immunofluorescence analysis. JC, EMS and AR selected brain samples. JC revised all the immunohistochemistry. ABP performed the statistical analysis. JC, EMS and MHG wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Ando K, Brion J-P, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R, et al. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol.* 2013 Jun;125(6):861-78. Doi: 10.1007/s00401-013-1111-z.
2. Ando K, Tomimura K, Sazdovitch V, Suain V, Yilmaz Z, Authelet M, et al. Level of PICALM, a key component of clathrin-mediated endocytosis, is correlated with levels of phosphotau and autophagy-related proteins and is associated with tau inclusions in AD, PSP and Pick disease. *Neurobiol Dis.* 2016 Oct;94:32-43. Doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.017.
3. Ando K, De Decker R, Vergara C, Yilmaz Z, Mansour S, Suain V, et al. Picalm reduction exacerbates tau pathology in a murine tauopathy model. *Acta Neuropathol.* 2020 Apr;139(4):773-89. Doi: 10.1007/s00401-020-02125-x.
4. Arakhamia T, Lee CE, Carlomagno Y, Duong DM, Kundinger SR, Wang K, et al. Posttranslational Modifications Mediate the Structural Diversity of Tauopathy Strains. *Cell.* 2020 Feb;180(4):633-644.e12. Doi: <https://doi.org/10.016/j.cell.2020.01.027>.
5. Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin.* 2016 Sep;126:238-92. Doi:10.1016/j.brainresbull.2016.08.018.
6. Arima K. Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: Immunoelectron microscopic demonstration of tau filaments in tauopathies. *Neuropathology.* 2006 Oct;26(5):475-83. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2006.00669.x>
7. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992 Mar;42(3):631-631. Doi:10.1212/wnl.42.3.631.
8. Aschenbrenner AJ, Gordon BA, Benzinger TLS, Morris JC, Hassenstab JJ. Influence of tau PET, amyloid PET, and hippocampal volume on cognition in Alzheimer disease. *Neurology.* 2018 Aug, 28;91(9):e859-66. Doi:10.1212/WNL.0000000000006075.
9. Beecham GW, Hamilton K, Naj AC, Martin ER, Huentelman M, Myers AJ, et al. Genome-Wide Association Meta-analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias. Gibson G, editor. *PLoS Genet.* 2014 Sep;10(9):e1004606. Doi:10.1371/journal.pgen.1004606.
10. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991 Sep;82(4):239-59. Doi:10.1007/BF00308809.
11. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and

- immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006 Oct;112(4):389-404. Doi:10.1007/s00401-006-0127-z.
12. Chen H, Wu G, Jiang Y, Feng R, Liao M, Zhang L, et al. Analyzing 54,936 Samples Supports the Association Between CD2AP rs9349407 Polymorphism and Alzheimer's Disease Susceptibility. *Mol Neurobiol.* 2015 Aug;52(1):1-7. Doi:10.1007/s12035-014-8834-2.
 13. Chibnik LB, White CC, Mukherjee S, Raj T, Yu L, Larson EB, et al. Susceptibility to neurofibrillary tangles: role of the PTPRD locus and limited pleiotropy with other neuropathologies. *Mol Psychiatry.* 2018 Jun;23(6):1521-9. Doi:10.1038/mp.2017.20.
 14. Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, et al. Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature.* 2014 Jan;505(7484):550-4. Doi:10.1038/nature12825.
 15. Cummins TD, Wu KZL, Bozatzki P, Dingwell KS, Macartney TJ, Wood NT, et al. PAWS1 controls cytoskeletal dynamics and cell migration through association with the SH3 adaptor CD2AP. *J Cell Sci.* 2018 Jan;131(1):jcs202390. Doi: 10.1242/jcs.202390.
 16. Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buée L, Hof PR, Watez A, et al. Specific Pathological Tau Protein Variants Characterize Pick's Disease: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 1996 Feb;55(2):159-68. Doi: <https://doi.org/10.1097/00005072-199602000-00004>.
 17. Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, et al. A Novel Adaptor Protein Orchestrates Receptor Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts. *Cell.* 1998 Sep;94(5):667-77. Doi:10.1016/S0092-8674(00)81608-6.
 18. Feng DN, Yang YH, Wang DJ, Meng DC, Fu R, Wang JJ, et al. Mutational analysis of podocyte genes in children with sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *Genet Mol Res.* 2014;13(4):9514-22. Doi: 10.4238/2014.November.11.16.
 19. Furusawa K, Takasugi T, Chiu Y-W, Hori Y, Tomita T, Fukuda M, et al. CD2-associated protein (CD2AP) overexpression accelerates amyloid precursor protein (APP) transfer from early endosomes to the lysosomal degradation pathway. *Journal of Biological Chemistry.* 2019 Jul;294(28):10886-99. Doi: 10.1074/jbc.RA118.005385.
 20. Gigante M, Pontrelli P, Montemurno E, Roca L, Aucella F, Penza R, et al. CD2AP mutations are associated with sporadic nephrotic syndrome and focal segmental

- glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009 June;24(6):1858-64. Doi:10.1093/ndt/gfn712.
21. GTEx Consortium, Laboratory, Data Analysis & Coordinating Center (LDACC)—Analysis Working Group, Statistical Methods groups—Analysis Working Group, Enhancing GTEx (eGTEx) groups, NIH Common Fund, NIH/NCI, et al. Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature*. 2017 Oct;550(7675):204-13. Doi: 10.1038/nature24277.
 22. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, et al. *TREM2* Variants in Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2013 Jan;368(2):117-27. Doi:10.1056/NEJMoa1211851.
 23. Hanseeuw BJ, Betensky RA, Jacobs HIL, Schultz AP, Sepulcre J, Becker JA, et al. Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol*. 2019 Aug;76(8):915. Doi:10.1001/jamaneuro.2019.1424.
 24. Harrison BJ, Venkat G, Lamb JL, Hutson TH, Drury C, Rau KK, et al. The Adaptor Protein CD2AP Is a Coordinator of Neurotrophin Signaling-Mediated Axon Arbor Plasticity. *J Neurosci*. 2016 Apr;36(15):4259-75. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.2423-15.2016.
 25. Hollingworth P, Harold D, Sims R, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):429-35. Doi:10.1038/ng.803.
 26. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2012 Jan;8(1):1-13. Doi:10.1016/j.jalz.2011.10.007.
 27. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018 Apr;14(4):535–62. Doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
 28. Jiang S, Bhaskar K. Degradation and Transmission of Tau by Autophagic-Endolysosomal Networks and Potential Therapeutic Targets for Tauopathy. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:586731. DOI: 10.3389/fnmol.2020.586731.
 29. Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Shiung MM, Weigand SD, Knopman DS, et al. β -amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol*. 2008 Feb;63(2):204-12. Doi:10.1002/ana.21223.

30. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*. 2015 Jan;77(1):43-51. Doi:10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
31. Kovacs GG. Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice: Neuropathology of tauopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015 Feb;41(1):3-23. Doi:10.1111/nan.12208.
32. Kunkle BW, Grenier-Boley B, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet*. 2019 Mar;51(3):414-30. Doi:10.1038/s41588-019-0358-2.
33. Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2013 Dec;45(12):1452-8. Doi:10.1038/ng.2802.
34. Lehtonen S, Tienari J, Londesborough A, Pirvola U, Ora A, Reima I, et al. CD2-associated protein is widely expressed and differentially regulated during embryonic development. *Differentiation*. 2008 Jun;76(5):506-17. Doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00255.x.
35. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000 Oct;279(4):F785-92. Doi:10.1152/ajprenal.2000.279.4.F785.
36. Liao F, Jiang H, Srivatsan S, Xiao Q, Lefton KB, Yamada K, et al. Effects of CD2-associated protein deficiency on amyloid- β in neuroblastoma cells and in an APP transgenic mouse model. *Mol Neurodegeneration*. 2015 Dec;10(1):12. Doi:10.1186/s13024-015-0006-y.
37. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019 Oct 3;179(2):312-39. Doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001.
38. Löwik M, Levtchenko E, Westra D, Groenen P, Steenbergen E, Weening J, et al. Bigenic heterozygosity and the development of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Oct;23(10):3146-51. Doi: 10.1093/ndt/gfn208.
39. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic

- guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011 May;7(3):263–9. Doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
40. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991 Apr 1;41(4):479–479. Doi:10.1212/wnl.41.4.479.
 41. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L-S, Vardarajan BN, Buross J, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):436–41. Doi: 10.1038/ng.801.
 42. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 May;71(5):362–81. Doi:10.1097/NEN.0b013e31825018f7.
 43. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013 Dec;19(12):1584–96. Doi:10.1038/nm.3407.
 44. Ojelade SA, Lee TV, Giagtzoglou N, Yu L, Ugur B, Li Y, et al. cindr, the Drosophila Homolog of the CD2AP Alzheimer's Disease Risk Gene, Is Required for Synaptic Transmission and Proteostasis. *Cell Rep*. 2019 Aug 13;28(7):1799-1813.e5. Doi:10.1016/j.celrep.2019.07.041.
 45. Ortega Roldan JL, Casares S, Ringkjøbing Jensen M, Cárdenes N, Bravo J, Blackledge M, et al. Distinct Ubiquitin Binding Modes Exhibited by SH3 Domains: Molecular Determinants and Functional Implications. Buday L, editor. *PLoS ONE*. 2013 Sep 11;8(9):e73018. Doi: 10.1371/journal.pone.0073018.
 46. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999 Mar;45(3):358–68. Doi:10.1002/1531-8249(199903)45:3<358::aid-ana12>3.0.co;2-x.
 47. Price JL, McKeel DW, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, et al. Neuropathology of nondemented aging: Presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*. 2009 Jul;30(7):1026–36. Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.002.
 48. Ramos de Matos M, Ferreira C, Herukka S-K, Soininen H, Janeiro A, Santana I, et al. Quantitative Genetics Validates Previous Genetic Variants and Identifies Novel Genetic Players Influencing Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers. *J Alzheimers Dis*. 2018;66(2):639–52. Doi:10.3233/JAD-180512.

49. Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. CN [Internet]. 2017 Jul 31 [cited 2021 Feb 18];15(6). Doi:10.2174/1570159X15666170116143743.
50. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993 Oct 15;90(20):9649–53. Doi: 10.1073/pnas.90.20.9649.
51. Sergeant N, Wattez A, Delacourte A. Neurofibrillary Degeneration in Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration. Tau Pathologies with Exclusively «Exon10» Isoforms. J Neurochem. marzo de 1999;72(3):1243-9. Doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0721243.x.
52. Shih N. Congenital Nephrotic Syndrome in Mice Lacking CD2-Associated Protein. Science. 8 de octubre de 1999;286(5438):312-5. Doi:10.1126/science.286.5438.312.
53. Shih N-Y, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP Localizes to the Slit Diaphragm and Binds to Nephrin via a Novel C-Terminal Domain. The American Journal of Pathology. 2001 Dec;159(6):2303–8. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)63080-5.
54. Shulman JM, Chen K, Keenan BT, Chibnik LB, Fleisher A, Thiyyagura P, et al. Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. JAMA Neurol. 2013 Sep 1;70(9):1150–7. Doi:10.1001/jamaneurol.2013.2815.
55. Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D, et al. Functional screening in Drosophila identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. Hum Mol Genet. 2014 Feb 15;23(4):870–7. Doi:10.1093/hmg/ddt478.
56. Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. Trends in Neurosciences. 1998 Oct;21(10):428–33. Doi:10.1016/s0166-2236(98)01337-x.
57. Sugimoto K, Miyazawa T, Enya T, Miyazaki K, Okada M, Takemura T. Cyclosporine A induced histological changes of Cathepsin L and CD2AP expression in renal glomeruli and tubules. Clin Exp Nephrol. 2017 Feb;21(1):83–91. Doi: 10.1007/s10157-016-1257-9.

58. Tan M-S, Yang Y-X, Xu W, Wang H-F, Tan L, et al. Associations of Alzheimer's disease risk variants with gene expression, amyloidosis, tauopathy, and neurodegeneration. *Alz Res Therapy*. 2021 Dec;13(1):15. Doi:10.1186/s13195-020-00755-7.
59. Tao Q-Q, Liu Z-J, Sun Y-M, Li H-L, Yang P, Liu D-S, et al. Decreased gene expression of CD2AP in Chinese patients with sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2017 Aug;56:212.e5-212.e10. Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.013.
60. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002 Jun 25;58(12):1791–800. Doi:10.1212/wnl.58.12.1791.
61. Therriault J, Benedet AL, Pascoal TA, Mathotaarachchi S, Chamoun M, Savard M, et al. Association of Apolipoprotein E ϵ 4 With Medial Temporal Tau Independent of Amyloid- β . *JAMA Neurol*. 2020 Apr 1;77(4):470. Doi: 10.1001/jamaneurol.2019.4421.
62. Tiraboschi P, Hansen LA, Masliah E, Alford M, Thal LJ, Corey-Bloom J. Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004 Jun 8;62(11):1977–83. Doi: 10.1212/01.wnl.0000128091.92139.0f.
63. Tsvetkov D, Hohmann M, Anistan YM, Mannaa M, Harteneck C, Rudolph B, et al. A *CD2AP* Mutation Associated with Focal Segmental Glomerulosclerosis in Young Adulthood. *Clin Med Insights Case Rep*. 2016 Jan;9:CCRRep.S30867. Doi: 10.4137/CCRRep.S30867.
64. Ubelmann F, Burrinha T, Salavessa L, Gomes R, Ferreira C, Moreno N, et al. Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. *EMBO Rep*. 2017;18(1):102–22. Doi:10.15252/embr.201642738.
65. Uchihara T. Pretangles and neurofibrillary changes: Similarities and differences between AD and CBD based on molecular and morphological evolution: Pretangles and tangles. *Neuropathology*. 2014 Dec;34(6):571-7. Doi: <https://doi.org/10.1111/neup.12108>.
66. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*. 2010 Dec;28(12):1248–50. Doi:10.1038/nbt1210-1248.

67. Van Acker ZP, Bretou M, Annaert W. Endo-lysosomal dysregulations and late-onset Alzheimer's disease: impact of genetic risk factors. *Mol Neurodegener.* 2019 03;14(1):20. Doi:10.1186/s13024-019-0323-7.
68. Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Jan;17(1):22-35. Doi: 10.1038/nrn.2015.
69. Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, de Silva R, Lees AJ, et al. Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain.* 2007 Jun;130(Pt 6):1566–76. Doi:10.1093/brain/awm104.
70. World Alzheimer report 2019. <http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2019.pdf>. 2019
71. Yan Y, Zhao A, Qui Y, Li Y, Yan R, Wang Y, et al. Genetic Association of FERMT2, HLA-DRB1, CD2AP, and PTK2B Polymorphisms With Alzheimer's Disease Risk in the Southern Chinese Population. *Front Aging Neurosci.* 2020 Feb 4;12:16. Doi:10.3389/fnagi.2020.00016.
72. Zhao, N., Liu, CC., Van Ingelgom, A.J. *et al.* APOE ϵ 2 is associated with increased tau pathology in primary tauopathy. *Nat Commun* 9, 4388 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06783-0>.

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, quería agradecer a mis directores el haber hecho posible realizar esta Tesis. Santiago, gracias por tu apoyo incondicional para la realización de estos dos estudios, nunca hubo un no cada vez que te solicitaba hacer más técnicas inmunohistoquímicas, dobles tinciones o incluso ampliar el número de casos. A Elena y Mar, muchas gracias por la paciencia que habéis demostrado conmigo. Durante mi etapa de residente, nunca había escrito un artículo y mucho menos había escrito nada científico en inglés. De hecho, los dos artículos de este trabajo son los primeros que he escrito y he aprendido muchísimo de las dos. Trabajar con vosotras ha sido un placer y siempre os estaré agradecida.

Quería agradecer también a Alberto Rábano, no sólo que nos ofreciera casos de la Fundación CIEN para aumentar el tamaño muestral del estudio de CD2AP sino que ha colaborado desinteresadamente, compartiendo su conocimiento y experiencia en las patologías neurodegenerativas, y ayudándonos a entender mejor los hallazgos del estudio.

A todas las personas que componen el servicio de Anatomía Patológica, a los patólogos porque me han ayudado a formarme en mi etapa de residente y a los técnicos porque sin ellos no podríamos diagnosticar ni investigar nada. En especial quiero agradecer a Teresa su buena actitud y predisposición cada vez que acudía a pedirle más técnicas inmunohistoquímicas u otras pruebas, sin ella este trabajo no hubiera podido realizarse.

A Sandra y a Marta quería agradecerles su amistad y compañerismo, por ayudarme y apoyarme siempre. Es todo un lujo trabajar con personas como vosotras.

A mi familia, Fran, Biel, Kai y a mis padres por vuestro apoyo y ayuda incondicional. Y en especial a ti Miriam, espero que estés donde estés sientas el orgullo que siempre he sentido de haberte tenido como hermana.