

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología Avanzada: Investigación y Aplicación

Especialidad en Biología Aplicada e Industrial

**EFECTO DE LAS
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA
DENSIDAD SOBRE LA
MICROVASCULATURA
CEREBRAL EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHÉIMER**

Autora:

Carmen Iribar Zubiaur

Director:

Sergio Montserrat de la Paz

Co-directora:

María del Carmen Millán Linares



Dr. Sergio Montserrat de la Paz, Profesor Titular de Universidad adscrito al Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

Dra. María del Carmen Millán Linares, Investigadora Postdoctoral FEDER Emergente adscrita al Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN:

Que el Trabajo Fin de Máster titulado “***Efecto de las lipoproteínas de alta densidad sobre la microvasculatura cerebral en la Enfermedad de Alzheimer***” y realizado por Doña Carmen Iribar Zubiaur ha sido realizado bajo su dirección y es apto para su presentación y defensa.

Y para que así conste, firma en Sevilla, a 1 de junio de 2023.

Dr. Sergio Montserrat de la Paz

Dra. M^a Carmen Millán Linares

ÍNDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD	3
1.2. FLUJO DE LAS HDL A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	4
1.3. HDL Y LA ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER.....	4
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ÉTICO.....	9
3.2. MEDIDAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS	9
3.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS HDL	9
3.4. MODELO <i>IN VITRO</i> DE BHE	9
3.5. AISLAMIENTO DE RNA Y RT-QPCR.....	10
3.6. ENSAYO DE ÉFLUJO DE COLESTEROL.....	10
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	11
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSIÓN.....	19
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	23

RESUMEN

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) juegan un papel importante en la patología de la enfermedad de Alzheimer (EA) y la demencia vascular, ya que tienen efectos tanto centrales como periféricos sobre la acumulación cerebral de beta-amiloide ($A\beta$) y las funciones vasculares. Sin embargo, sigue sin estar claro hasta qué punto las HDL pueden intercambiar sus componentes proteicos y lipídicos entre el sistema nervioso central (SNC) y la circulación sistémica. Este estudio pretende evaluar el efecto de HDL aisladas de voluntarios sanos (hHDL) y pacientes con síndrome metabólico (msHDL) en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i), componentes principales de la barrera hematoencefálica (BHE). Las células HBEC-5i se pre-estimularon con $A\beta$ (500 nM) y 1 h después se trataron con hHDL o msHDL a 300 μ g de proteína/mL durante 24 h. Además, se utilizaron ApoE- ϵ 2 y ApoE- ϵ 4 como control a 10 μ g/mL. Se analizó la capacidad de eflujo de colesterol y se aisló ARN para realizar RT-qPCR. Se midió la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria, como IL-6, IL-1 β , TNF α y transportadores ABC (ABCA1 y ABCB1). Además, se midió la expresión de la proteína relacionada con el receptor de LDL 1 (LRP1), genes del metabolismo lipídico (SR-BI, LDLR, EL, CD36, FATP y S1PR1) y moléculas de adhesión celular (CAM) como la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). Nuestros resultados mostraron que las msHDL aumentaban la expresión de citocinas proinflamatorias y reducían los genes relacionados con la eliminación de $A\beta$, como ABCA1 y LRP1, en las células HBEC-5i, confirmando así que las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad invierten las propiedades protectoras de las HDL en la BHE.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura y función de las lipoproteínas de alta densidad

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) representan una amplia variedad de lipoproteínas con una densidad comprendida entre 1.063-1.210 g/mL y un tamaño medio de 8-10 nm. La estructura fundamental de una partícula de HDL incluye un núcleo central de ésteres de colesterol (CE) y otros lípidos apolares rodeado por una monocapa de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas (apo), siendo las mayoritarias apoA-I y apoA-II (Tran-Dinh et al., 2013). Como se observa en la **Figura 1**, la biosíntesis de las HDL ocurre en el hígado e intestino, donde se sintetiza apoA-I y se secreta al plasma. Una vez en sangre, apoA-I interacciona con el transportador dependiente de ATP (*ATP binding cassette subfamily A member 1*, ABCA1), el cual se expresa en la mayoría de las células, que ceden sus lípidos, mayoritariamente colesterol libre, a apoA-I generando una nueva partícula de HDL (pre β -HDL). La enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), presente en las partículas de HDL, favorece la generación de CE, que forma el núcleo de las partículas de HDL maduras. Una vez cargadas las HDL con CE pueden ser captadas de forma directa por el hígado a través del receptor *scavenger* (*Scavenger receptor class B type I*, SR-BI); o bien se produce la transferencia de CE a lipoproteínas que contienen apoB, generalmente a cambio de triacilglicérols (TAG), por la proteína de transferencia CE (CETP). En resumen, las HDL se convierten en el principal vehículo para el transporte de colesterol desde las células periféricas al hígado para su excreción y catabolismo, es decir, el transporte inverso de colesterol (RCT) (Ong et al., 2022).

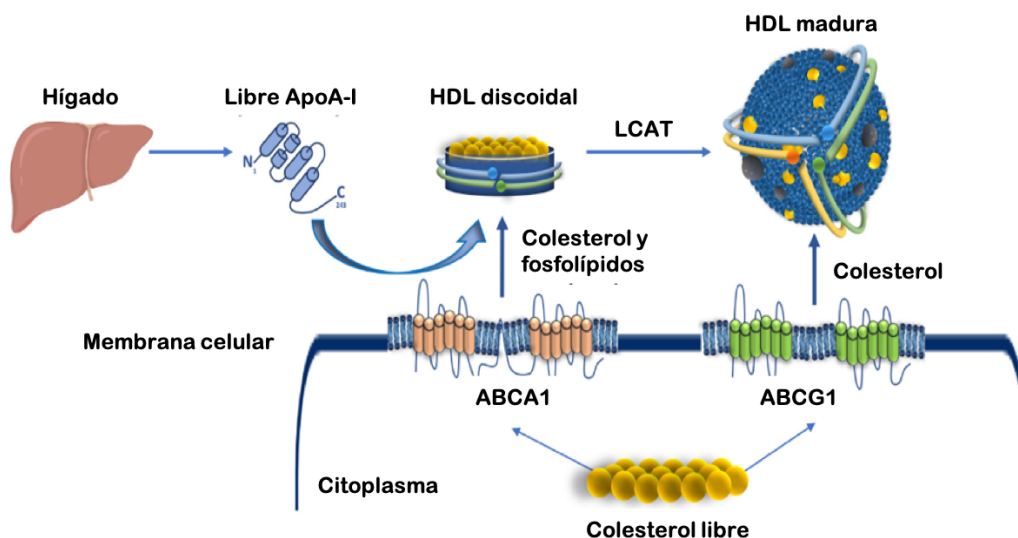


Figura 1. Biosíntesis de las HDLs. APOA-I libre de lípidos es secretada por el hígado a la circulación, donde acepta fosfolípidos y colesterol que efluyen desde las células vía ABCA1 para formar HDL discoidales, que se convierten en HDL esféricas por LCAT y ABCG1 (Ong et al., 2022).

El estudio de la composición y función de las HDL se ha convertido en un tema de gran interés, particularmente a la luz de los datos clínicos desalentadores de las terapias basadas en el aumento de colesterol HDL (HDL-C), y la falta de asociación entre el HDL-C y el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) (Lochhead et al., 2020). Este fenómeno se atribuye a la amplia heterogeneidad y gran diversidad funcional de las HDL. La implementación de estudios proteómicos basados en espectrometría de masas ha permitido identificar más de 200 proteínas asociadas a las HDL. Además de apoA-I y -II, las HDL expresan otras apolipoproteínas que incluyen ApoC-III, ApoL1, ApoE, ApoC-I, ApoC-II y ApoM (Paternò et al. 2004). El contenido de proteínas se ha relacionado principalmente con los siguientes procesos biológicos: metabolismo y transporte de lípidos, hemostasia y respuesta inmune. Se sabe desde hace años que las HDL son potentes inhibidores de la inflamación al ser capaces de reducir la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y dificultar la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, proceso mediado por la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Las HDL también desempeñan un papel importante en la reducción de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y otras lipoproteínas, al actuar como aceptores y detoxificadores de los hidroperóxidos lipídicos y al contener enzimas importantes como la paraoxonasa 1 (PON1) y el factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH) (Grao-Cruces et al., 2022).

1.2. Flujo de las HDL a través de la Barrera Hematoencefálica

Las células de microvasculatura cerebral son células endoteliales especializadas del Sistema Nervioso Central (SNC) y encargadas de la formación de la barra hematoencefálica (BHE). La BHE es una barrera física y metabólica que permite mantener la homeostasis del SNC, protegiendo al cerebro de sustancias nocivas. Su baja permeabilidad es muy importante a la hora del paso de sustancias desde la circulación sistémica al cerebro. Sin embargo, la impermeabilidad de la BHE no es absoluta. De hecho, permite el transporte regulado de diversas moléculas como la glucosa, aminoácidos y electrolitos, así como moléculas lipofílicas con pesos moleculares inferiores a 500 Da. Los principales factores que limitan la permeabilidad de la BHE son su baja tasa de pinocitosis y los complejos proteicos de las uniones intercelulares. Los tipos de uniones intercelulares en la BHE son las uniones adherentes, las uniones estrechas y las uniones Gap (Di Angelantonio et al., 2009; Lochhead et al., 2020; Claesson-Welsh et al., 2020).

Las moléculas de HDL atraviesan la BHE mediante un transporte transendotelial que se encuentra modulado por diferentes receptores. La HDL es internalizada en la superficie luminal por el endotelio y se desplaza a través de la célula endotelial, siendo finalmente

excitada en la membrana basal (Fung et al., 2017). En la transcitosis de HDL intervienen dos receptores de superficie de las células endoteliales que son SR-BI y ABCs. Sin embargo, se cree que hay más receptores implicados en el transporte transendotelial de HDL que son responsables de sus funciones protectoras (**Figura 2**) (Robert et al., 2021).

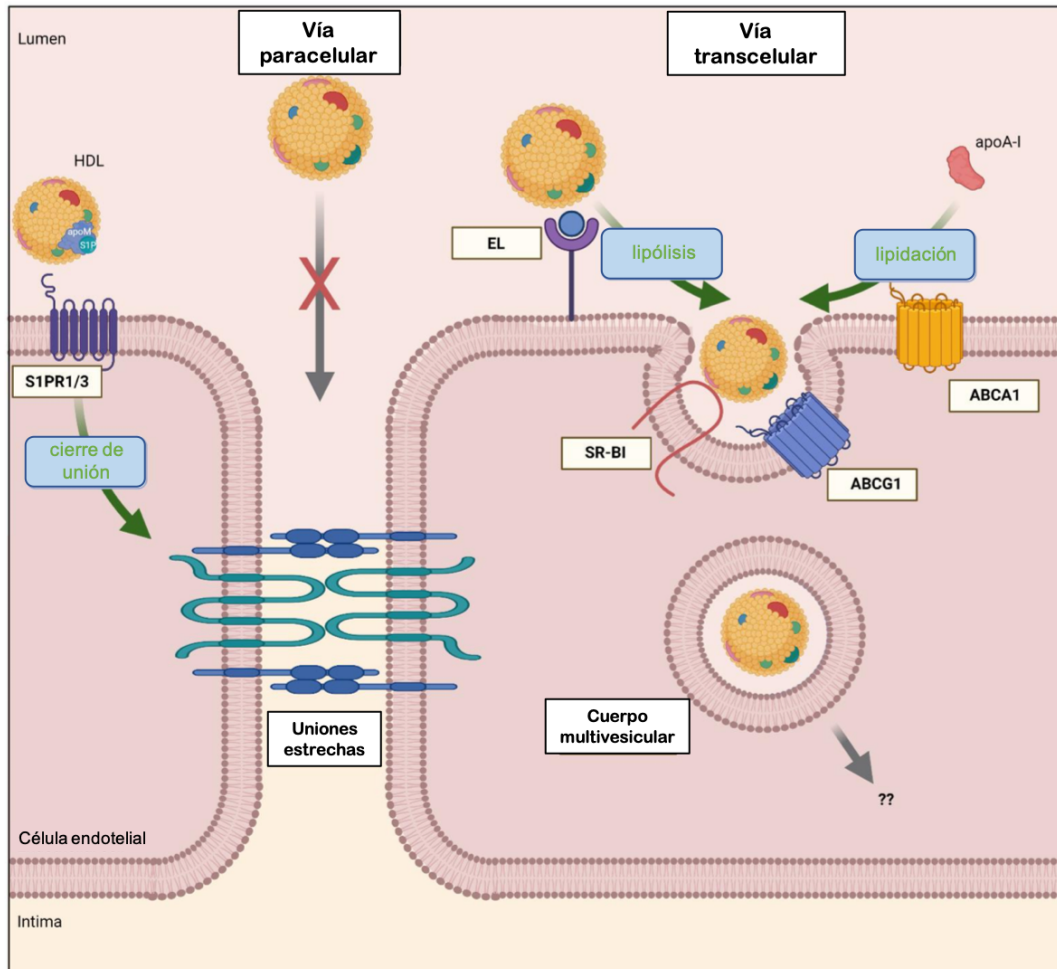


Figura 2. Transporte transendotelial de las HDL. Las HDL se unen a lipasa endotelial (EL) que las rompe para generar partículas de HDL con menor diámetro de paso. La HDL resultante se unen a SR-BI y ABCs y se internalizan. La apoA-I libre de lípidos es lipídada por ABCA1 antes de ser transportada como HDL (Robert et al., 2021).

En el año 2004 se observó que las moléculas de HDL podían presentar una función neuroprotectora para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares (Paternò et al. 2004). Asimismo, en estudios posteriores realizados sobre el efecto de las HDL en la BHE, se ha comprobado que las HDL tienen efectos neuroprotectores sobre las células de microvasculatura cerebral (Lapergue et al., 2004; Lapergue et al., 2013). De hecho, como se observa en la **Figura 3**, ejercen un gran número de funciones vasoprotectoras sobre las células endoteliales (Robert et al., 2021): 1) supresión de moléculas de adhesión endotelial como VCAM-1 e ICAM-1, impidiendo así la trans migración de leucocitos a través de la pared

vascular, II) inhibición de las especies reactivas del oxígeno, III) fomento de la angiogénesis y la reparación endotelial, IV) fomento del cierre de la unión endotelial, entre otras.

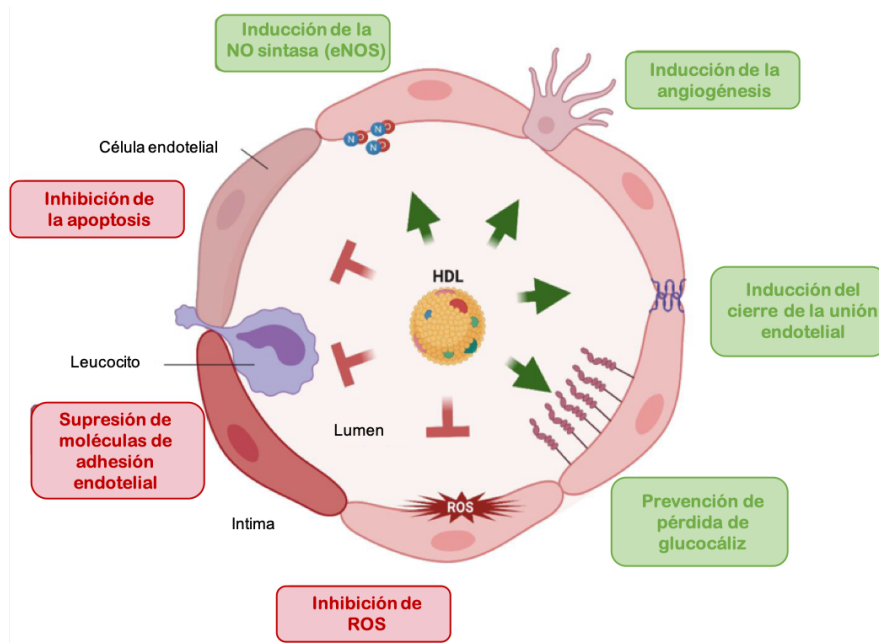


Figura 3. Funciones vasoprotectoras ejercidas por las HDL sobre la microvasculatura cerebral. Las HDL aumentan (verde) las funciones vasoprotectoras y suprimen (rojo) las funciones nocivas del endotelio (Robert et al., 2021).

1.3. HDL y la Enfermedad de Alzhéimer

Estudios recientes han sugerido que las HDL puede que no sean tan beneficiosas como se pensaba, al menos en pacientes con problemas cardiovasculares. Los factores de riesgo de ECV, como la hipertensión, la resistencia a la insulina, la obesidad y la hipercolesterolemia, aumentan el riesgo de padecer la Enfermedad de Alzhéimer (EA) (Cortes-Canteli et al., 2020). Se ha observado que el colesterol del cerebro se encuentra relacionado con el metabolismo amiloide. Los niveles de apoA-I pueden regular el depósito de beta-amiloide ($A\beta$) en el cerebro y de esta forma disminuir el riesgo de formar placas en el cerebro. Además, el colesterol altera la degradación de la proteína precursora de amiloide (APP) por lo que desempeña un papel fundamental en la patogénesis de EA (Saczynski et al., 2007) (Reitz et al., 2010). El mecanismo por el cual las moléculas de HDL y la ApoA-I actúan reduciendo la acumulación de $A\beta$ en el cerebro es aún desconocida. Aún así, se cree que las HDL actúan acelerando la salida de $A\beta$ del cerebro a la sangre a través del “efecto sumidero”. El aclaramiento de $A\beta$ a través de la BHE implica la capacidad de ambas moléculas de atravesar la barrera (Dal Magro et al., 2019). Por último, recientes estudios han demostrado que HDL enriquecidas en ApoE proporcionan resistencia vascular a $A\beta$. Esta apolipoproteína tiene tres isoformas diferentes: apoE- ϵ 2, apoE- ϵ 3 y apoE- ϵ 4, siendo la ApoE- ϵ 4 la isoforma

con mayor riesgo genético para la EA ya que promueve la fibrilación de A β directamente; mientras que la isoforma de apoE- ϵ 2 se asocia con un papel protector frente al desarrollo de la EA ya que muestra una menor capacidad de unión con el receptor de las LDL (LDLR) (Robert et al., 2020; Grao-Cruces et al., 2023). Por otro lado, la isoforma apoE- ϵ 4 también se ha relacionado con procesos de neuroinflamación que participan en EA (Parhizkar et al., 2022).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debido a la relevante función e implicación de las HDL en el desarrollo de EA y que los cambios en su lipoproteoma influyen en las desviaciones del “colesterol bueno” en condiciones de alto riesgo de EA, es interesante buscar una explicación a cómo afecta el lipoproteoma de las HDL en el desarrollo de EA. El modelo *in vitro* de BHE con células de microvasculatura cerebral nos ayudará a comprender cómo las HDL atraviesan la barrera y reaccionan pudiendo contribuir a la progresión de EA. Por todo ello, proponemos como objetivo general evaluar el efecto de las HDL sobre la microvasculatura cerebral y su contribución al desarrollo de la EA.

Para alcanzar el objetivo general, los objetivos específicos del presente estudio son los siguientes:

1. Estudiar el efecto de las HDL aisladas de sujetos sanos y de pacientes con síndrome metabólico sobre células de microvasculatura cerebral HBEC-5i.
2. Estudiar el efecto de las HDL aisladas de sujetos sanos y de pacientes con síndrome metabólico, así como el efecto de ApoE- ϵ 2 y ApoE- ϵ 4, sobre células de microvasculatura cerebral HBEC-5i estimuladas con A β .

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño Experimental y Ético

Este estudio se realizó de acuerdo con las Pautas de Buena Práctica Clínica y con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica Humana del Hospital Universitario Virgen Macarena (PI00082017), y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito (ClinicalTrials.gov no. NCT05746013). En este estudio se incluyeron un total de 40 sujetos, divididos en dos cohortes diferentes, 20 sujetos de peso normal y 20 pacientes con síndrome metabólico.

3.2. Medidas Clínicas y Bioquímicas

Los datos antropométricos, como la altura, el peso, el porcentaje de grasa corporal y la circunferencia de la cintura y la muñeca, fueron medidos por personal capacitado. Se utilizó el analizador de composición corporal TANITA (Modelo BC-545N) para medir el peso ($\pm 0,1$ kg), la altura ($\pm 0,1$ cm), el índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal. La circunferencia de la cintura se midió exactamente a mitad de camino entre la costilla inferior y la cresta ilíaca y la circunferencia de la muñeca justo debajo del hueso. La presión arterial sistólica y diastólica se midió con un método estándar. Se tomaron muestras de sangre venosa tras 12 horas de ayuno, se midió la glucosa, el colesterol total, el HDL-C y los triacilglicéridos mediante métodos colorimétricos (BioScience Medical), y el LDL-C se calculó con la fórmula de Friedewald.

3.3. Aislamiento y Purificación de las HDL

Las HDL se aislaron a partir de plasma obtenido de sangre recogida en tubos K₂EDTA tras centrifugación (1400 g, 10 min a 4 °C). Las HDL se purificaron con un método de precipitación e inmunoadfinidad usando un kit comercial (STA-608, CellBiolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la concentración de proteínas totales se usó utilizando el método del ácido bicinónico (BCA, ThermoFisher Scientific).

3.4. Modelo *in vitro* de BHE

Las células endoteliales de microvasculatura cerebral humana HBEC-5i (ATCC-CRL-3245) fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino y 1% penicilina y estreptomina. Las células HBEC-5i se cultivaron a una densidad de 5×10^5 y hasta confluencia en placas de 12 pocillos. Tras la formación de la monocapa, se trataron durante 24 h con una concentración fisiológica (300 μ g de proteínas/mL) de HDL aisladas y purificadas de voluntarios sanos (hHDL) y pacientes con síndrome metabólico (msHDL). Para asegurar que la exposición de las HDL no indujo una alteración de las propiedades de la BHE,

se evaluó la integridad de la monocapa mediante la medición de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) utilizando un Minicell ERS-2 (Millipore), debiendo alcanzar una resistencia de $1000 \Omega/\text{cm}^2$, aproximadamente. Para reproducir el medio neuroinflamatorio en el contexto de la EA, 1 hora antes del tratamiento con las HDL, se adicionó 500 nM de fibrillas $A\beta_{1-42}$ (Sigma-Aldrich) disuelto en dimetilsulfóxido. Finalmente, se utilizó como control el tratamiento con ApoE- $\epsilon 2$ y ApoE- $\epsilon 4$ (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 μg de proteína/mL.

3.5. Aislamiento de RNA y RT-qPCR

El RNA total se extrajo de las células HBEC-5i utilizando el reactivo TRIzol (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA se evaluó en función de la relación A_{260}/A_{280} en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (ThermoFisher Scientific). El RNA (1 μg) se sometió a transcripción inversa utilizando el kit de síntesis de cDNA iScript (BioRad). Los niveles de expresión de mRNA de genes específicos se midieron mediante RT-qPCR en el sistema CFX96 (BioRad). Para cada reacción de PCR, se añadió 2 ng de cDNA a la mezcla de SYBR Green PCR Master Mix (BioRad) que contenía la pareja de cebadores para cada gene de estudio. Los cebadores se diseñaron utilizando el software Primer3 Input y se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las secuencias de los cebadores se detallan en la **Tabla 1**. Todas las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado, y se utilizó el número medio de ciclos umbral (Ct) de los triplicados para calcular la expresión relativa de mRNA de cada una de ellas. La magnitud del cambio en la expresión de mRNA de los genes de estudio se calculó mediante el método estándar $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$. Todos los datos se normalizaron con respecto al contenido de los genes de referencia endógenos (GAPDH y HPRT) y se expresaron como unidad relativa.

3.6. Ensayo de Eflujo de Colesterol

El eflujo de colesterol se determinó utilizando TopFluor-cholesterol, una sonda de colesterol fluorescente en la que la molécula de colesterol está unida a BODIPY (Avanti Polar Lipids). Las células HBEC-5i ($1,2 \times 10^5$ /pocillo) se sembraron en placas de 48 pocillos y se dejaron crecer en DMEM hasta confluencia. A continuación, las células se marcaron durante 1 h en un medio DMEM que contenía 0,125 mmol/L de colesterol total, donde el colesterol fluorescente representó el 20% del colesterol total junto con 10 mmol/L metil- β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich). Las células marcadas se equilibraron posteriormente durante 18 h con DMEM que contenía BSA libre de ácidos grasos al 0,2% (Sigma-Aldrich) y luego se incubaron durante 24 h con 50 mg/dL HDL obtenidas de sujetos sanos (hHDL) y de pacientes con síndrome metabólico (msHDL) en RPMI. Luego se midió la intensidad de la fluorescencia en el medio utilizando el lector de microplacas, Infinite M nano (Tecan) a $\lambda_{\text{Ex/Em}} = 485/530 \text{ nm}$.

Las células se solubilizaron con ácido cólico al 1% y se mezclaron en un agitador de placas durante 4 h a temperatura ambiente y se cuantificó la intensidad de la fluorescencia. La capacidad de eflujo de colesterol se calculó de acuerdo con la fórmula: [fluorescencia del medio/(fluorescencia del medio + fluorescencia de las células)] x 100. Todas las condiciones se ejecutaron por triplicado y todo el ensayo se realizó en presencia del inhibidor de ACAT a 5 μ M.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos de genes utilizados para el análisis RT-PCR.

<i>Gen</i>	<i>Número de acceso</i>	<i>Nombre del gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Secuencia del primer</i>
GAPDH	NM_0012897452	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>h GAPDH L</i> <i>h GAPDH R</i>	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT ACGACCAAATCCGTTGACTC
HPRT	NM_002046.6	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa	<i>h HPRT L</i> <i>h HPRT R</i>	GAGTCAACGGATTTGGTCTGT GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
TNFα	NM_000594.4	Factor de necrosis tumoral tipo α	<i>h TNFα L</i> <i>h TNFα R</i>	CACATACTGACCCACGGCTC AGAGGCTGAGGAACAAGCAC
IL-1β	NM_000576.2	Interleucina 1 β	<i>h IL-1β L</i> <i>h IL-1β R</i>	CTGTCCTGCGTGTGAAAGA TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA
IL-6	NM_0013180952	Interleucina 6	<i>h IL-6 L</i> <i>h IL-6 R</i>	TGCAATAACCACCCCTGACC GCTACATTTGCCGAAGAGCC
ABCA1	NM_005502.4	Miembro 1 de la subfamilia del casete de unión a ATP	<i>h ABCA1 R</i> <i>h ABCA1 R</i>	AACAGTTTGTGGCCCTTTTG AGTCCAGGCTGGGGTACTT
ABCB1	NM_0013489452	Miembro 1 de la subfamilia B del casete de unión a ATP	<i>h ABCB1 L</i> <i>h ABCB1 R</i>	GCTCCTGACTATGCCAAAGC TCTTACCTCCAGGCTCAGT
SR-BI	NM_001367981.1	Receptor carroñero clase B tipo I	<i>h SR-BI L</i> <i>h SR-BI R</i>	CTGTGGGTGAGATCATGTGG GCCAGAAGTCAACCTTGCTC
LRP1	NM_002332.3	Proteína 1 relacionada con el receptor LDL	<i>h LRP1 L</i> <i>h LRP1 R</i>	AGCAAACGAGGCCTAAGTCA GCTGCTTGTGCTGATGGTAA
LDLR	NM_000527.5	Receptor LDL	<i>h LDLR L</i> <i>h LDLR R</i>	GAATTTGGCCAGACACAGGT CACCGTACCCAGCTGATTTT
EL	NM_006033.4	Lipasa endotelial	<i>h EL L</i> <i>h EL R</i>	TTGGTGTGTCAATCCAGCATT GCCACCCAGGATTTTATTT
CD36	NM_001371075.1	Molécula CD36	<i>h EL R</i> <i>h CD36 R</i>	GCCACCCAGGATTTTATTT CAGGGCCTAGGATTTGTTGA
FATP	NM_198580.3	Proteína transportadora de ácidos grasos	<i>h FATP L</i> <i>h FATP R</i>	CCACTTGGATGTCACCACTG GTGGGACCCTCCAGTAGACA
S1PR1	NM_0013207302	Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato	<i>h FATP R</i> <i>h S1PR1 R</i>	GTGGGACCCTCCAGTAGACA AGTATTGCTCCCGTTGTGG
VCAM1	NM_001078.4	Molécula de adhesión de células vasculares 1	<i>h VCAM1 L</i> <i>h VCAM1 R</i>	TAAAAATGCCTGGGAAGATGG GGTGCTGCAAGTCAATGAGA
ICAM1	NM_000201.3	Molécula de adhesión intercelular 1	<i>h VCAM1 L</i> <i>h ICAM1 R</i>	GGCTGGAGCTGTTTGAAGAAC ACTGTGGGGTTCAACCTCTG

3.7. Análisis estadísticos.

Todos los valores están expresados como medias aritméticas \pm desviaciones estándar (DE). Los datos se evaluaron con el software GraphPad Prism versión 8.0. La significación estadística de cualquier diferencia en cada parámetro entre los grupos se evaluó mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA), siguiendo la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El *t*-test se utilizó para evaluar la diferencia entre el efecto entre sanos y síndrome metabólico. Los valores de *p* inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

En primer lugar, se recogieron los datos clínicos obtenidos de las cohortes del estudio. En la **Tabla 2** se representan sus principales características clínicas que se incluyeron en el estudio. Las dos poblaciones no presentaban diferencias en cuanto a la distribución por sexos y edad; por lo tanto, las cohortes del estudio son comparables. Los participantes con síndrome metabólico (MetS) mostraron diferencias significativas (p -valor $< 0,05$) en comparación con la cohorte sana en los parámetros de IMC, glucosa, colesterol total, LDL-C, circunferencia de la cintura, porcentaje de grasa corporal, índice de grasa visceral, PAS y PAD.

Tabla 2. Datos clínicos de las cohortes del estudio.

	Sanos (media \pm SD)	MetS (media \pm SD)	p -value
Hombre (n)	9	7	
Mujer (n)	11	13	
Edad (años)	34.35 \pm 8.49	40.15 \pm 9.62	0.0503
IMC (kg/cm ²)	22.88 \pm 2.70	36.32 \pm 6.10	< 0.0001
PAS (mmHg)	117.60 \pm 9.44	131.20 \pm 21.24	0.0241
PAD (mmHg)	80.50 \pm 8.12	101.20 \pm 12.05	0.0007
Grasa corporal (%)	23.24 \pm 8.68	41.65 \pm 8.27	< 0.0001
Circunferencia de la cintura (cm)	79.59 \pm 10.19	119.10 \pm 17.00	< 0.0001
Grasa visceral (index)	4.03 \pm 2.33	12.93 \pm 2.08	< 0.0001
Glucosa (mg/dL)	83.69 \pm 7.20	115.10 \pm 25.57	< 0.0001
TAGs (mg/dL)	61.86 \pm 27.82	121.20 \pm 96.53	0.0119
Colesterol total (mg/dL)	162.80 \pm 28.08	209.70 \pm 31.93	< 0.0001
HDL-C (mg/dL)	44.13 \pm 11.25	55.75 \pm 26.95	0.0832
LDL-C (mg/dL)	106.30 \pm 23.64	129.70 \pm 35.50	0.0189

IMC, índice de masa corporal; PAD, presión arterial diastólica; HDL-C, colesterol de lipoproteínas de alta densidad LDL, colesterol de lipoproteínas de baja; PAS, presión arterial sistólica; TAGs, triacilglicéridos..

Una vez obtenida la sangre, y posteriormente el plasma, se aislaron las HDL, obteniendo hHDL (aislada de la cohorte de sujetos sanos) y msHDL (aislada de la cohorte de pacientes con MetS). En primer lugar, se trató con HDLs las células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i), y se observó la expresión diferencial que presentaban los genes inflamatorios. En la **Figura 4**, se puede observar un ligero aumento en la expresión de TNF α (Fig. 4A) y IL-1 β (Fig. 4C) en las muestras que habían sido tratadas con msHDL mientras que la expresión de IL-6 (Fig. 4E) aumentó de forma significativa tras el tratamiento con msHDL en comparación con hHDL ($p = 0.004$). En el contexto de EA, es decir, las células HBEC-5i, pre-estimuladas con A β ₁₋₄₂, las hHDL disminuyeron significativamente la expresión de TNF α (Fig. 4B, $p < 0.001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las distintas HDL ni entre la exposición a ApoE- ϵ 2 o ApoE- ϵ 4. Del mismo modo, la expresión de

la IL-1 β (Fig. 4D) disminuyó de forma significativa con la presencia de hHDL ($p = 0.029$), y aumentó con la presencia msHDL ($p = 0.046$), de forma similar a lo ocurrido con la expresión de IL-6 (Fig. 4F). Por último, la expresión de los genes IL-1 β e IL-6 aumentó en presencia de ApoE- ϵ 4 ($p = 0.001$ y $p = 0.038$, respectivamente) comparado con la expresión en presencia de ApoE- ϵ 2.

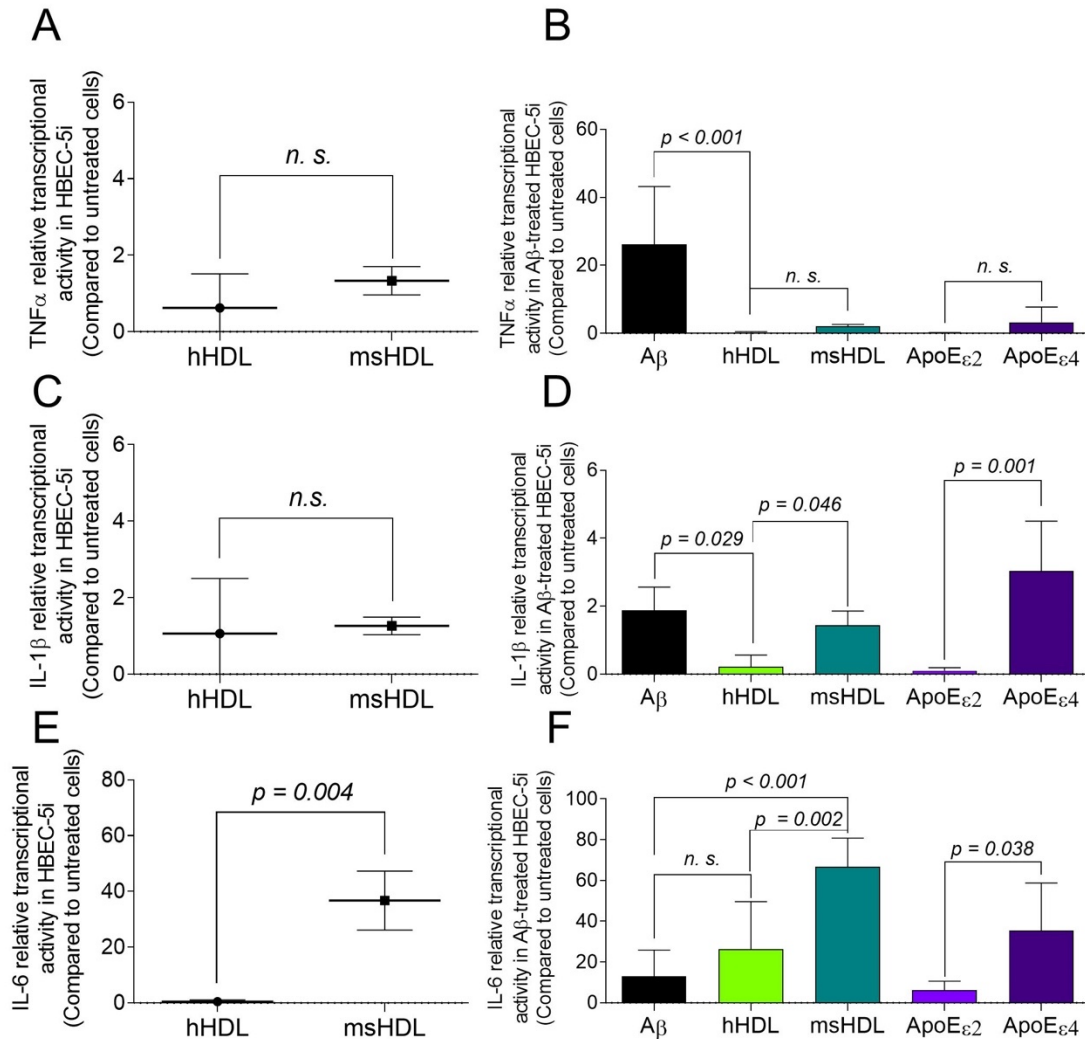


Figura 4. Las gráficas (A, C y E) representan la actividad transcripcional de los genes TNF α (A), IL-1 β (C) e IL-6 (E) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEc-5i) en presencia de HDL (300 μ g de proteínas/mL) aisladas de sujetos sanos (hHDL) y de pacientes con síndrome metabólico (msHDL). Las gráficas B, D y F representan la actividad transcripcional de los genes TNF α (B), IL-1 β (D) y IL-6 (F) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEc-5i) pre-tratadas (1 h) con A β ₁₋₄₂ (500nm) en presencia de hHDL, de msHDL, ApoE- ϵ 2 y ApoE- ϵ 4 (10 μ g de proteína/mL). Los valores representan las medias aritméticas \pm la desviación estándar ($n = 6$).

En segundo lugar, se analizó la expresión de los transportadores dependientes de ATP llamados ABC del inglés *ATP-binding cassette* y la expresión del receptor SR-BI que son un

grupo de proteínas transportadoras que en la BHE ha mostrado un papel esencial en el aclaramiento de $A\beta_{1-42}$, sacando del SNC hacia la sangre los agregados proteicos (**Figura 5**).

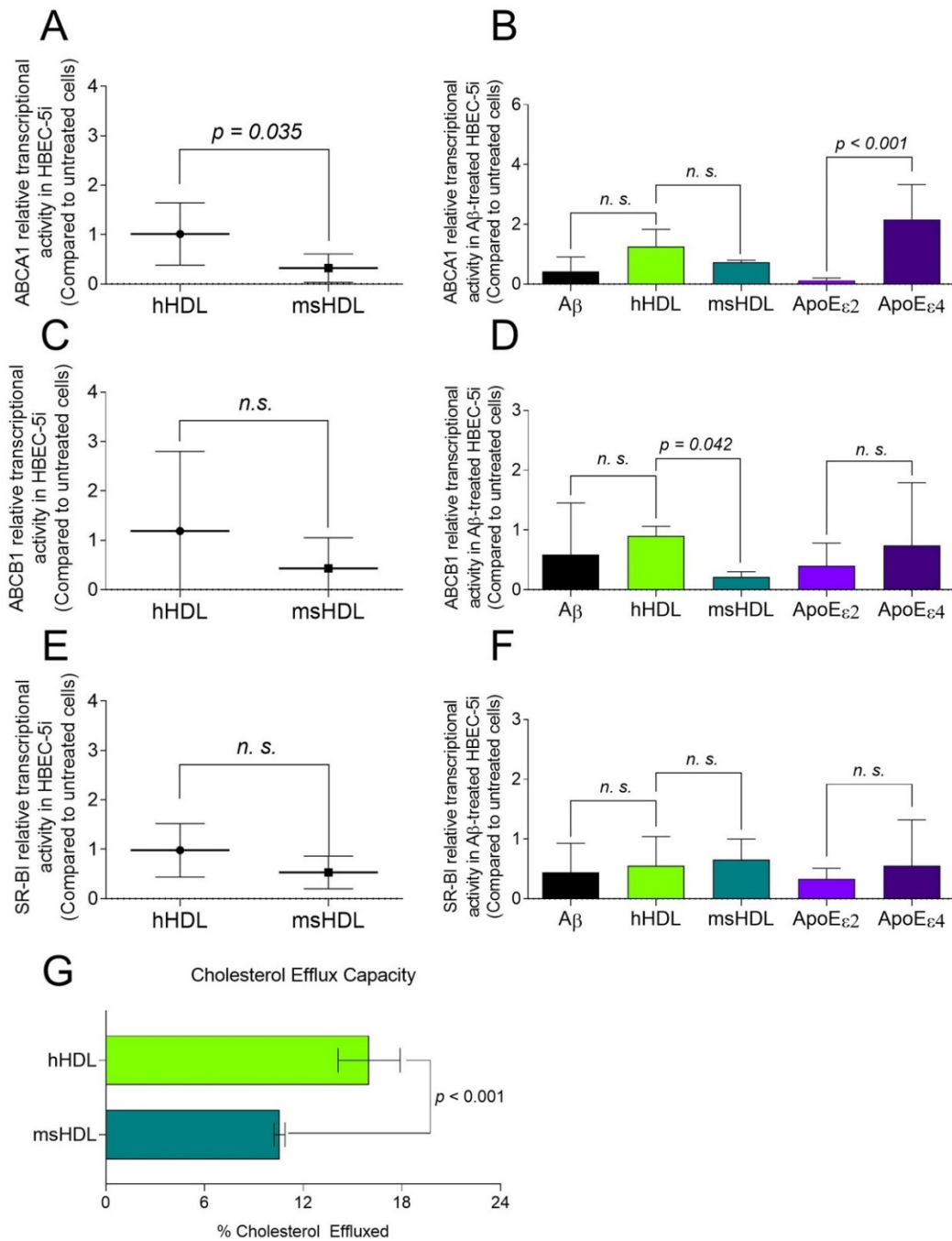


Figura 5. Las gráficas (A, C y E) representan la actividad transcripcional de los genes ABCA1 (A), ABCB1 (C) y SR-BI (E) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) en presencia de HDL (300 μ g de proteínas/mL) aisladas de sujetos sanos (hHDL) y de pacientes con síndrome metabólico (msHDL). Las gráficas B, D y F representan la actividad transcripcional de los genes ABCA1 (B), ABCB1 (D) y SR-BI (F) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) pre-tratadas (1 h) con $A\beta_{1-42}$ (500nm) en presencia de hHDL, de msHDL, ApoE- ϵ 2 y ApoE- ϵ 4 (10 μ g de proteína/mL). La gráfica G compara la capacidad de eflujo de colesterol en hHDL frente a msHDL. Los valores representan las medias aritméticas \pm la desviación estándar ($n = 6$).

La expresión de ABCA1 (Fig. 5A), ABCB1 (Fig. 5C) y SR-BI (Fig. 5E) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) aumentó tras la exposición a hHDL en comparación con msHDL, siendo significativa para ABCA1 ($p = 0.035$). En cuanto a su expresión en condiciones de EA, la presencia de $A\beta_{1-42}$ produce un descenso de la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCB1, en comparación a las células sin tratar con $A\beta_{1-42}$. Cabe destacar que la exposición a ApoE- $\epsilon 4$ aumentó de forma significativa la expresión de ABCA1 (Fig. 5B, $p < 0.001$) en comparación con ApoE- $\epsilon 2$ y que la exposición a msHDL redujo la expresión de ABCB1 (Fig. 5D, $p = 0.042$) en comparación con la exposición a hHDL. Finalmente, se analizó la capacidad de eflujo de colesterol de las HDL aisladas de los dos grupos de sujetos y se observó que era significativamente mayor en las hHDL comparadas con aquellas aisladas de sujetos con MetS ($p = 0.001$).

A continuación, se estudió la expresión de LRP1 que participa en el aclaramiento de $A\beta$; entre muchas otras funciones (**Figura 6**). Se vio que la expresión de este gen era significativamente mayor en las muestras que habían sido expuestas a hHDL frente a las expuestas con msHDL ($p = 0.009$). En el contexto de la EA, la exposición a hHDL y ApoE- $\epsilon 2$ aumentó la expresión de LRP1 en comparación con msHDL y ApoE- $\epsilon 4$, respectivamente ($p = 0.042$ y $p = 0.027$, respectivamente).

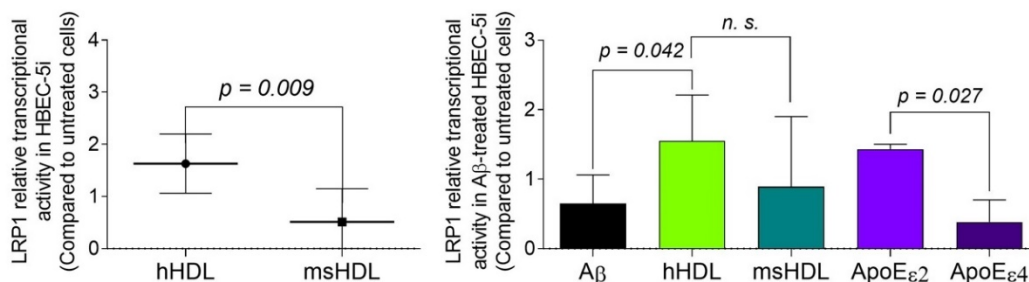


Figura 6. La gráfica de la izquierda representa la actividad transcripcional del gen LRP1 en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) en presencia de HDL (300 μg de proteínas/mL) aisladas de sujetos sanos (hHDL) y de pacientes con síndrome metabólico (msHDL). La gráfica de la derecha representa la actividad transcripcional del gen LRP1 en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) pre-tratadas (1 h) con $A\beta_{1-42}$ (500nm) en presencia de hHDL, de msHDL, ApoE- $\epsilon 2$ y ApoE- $\epsilon 4$ (10 μg de proteína/mL). Los valores representan las medias aritméticas \pm la desviación estándar ($n = 6$).

A continuación, se midió la expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo lipídico (**Figura 7**). En el caso del receptor LDLR, no se observan diferencias significativas tras la exposición con las diferentes HDL (Fig. 7A).

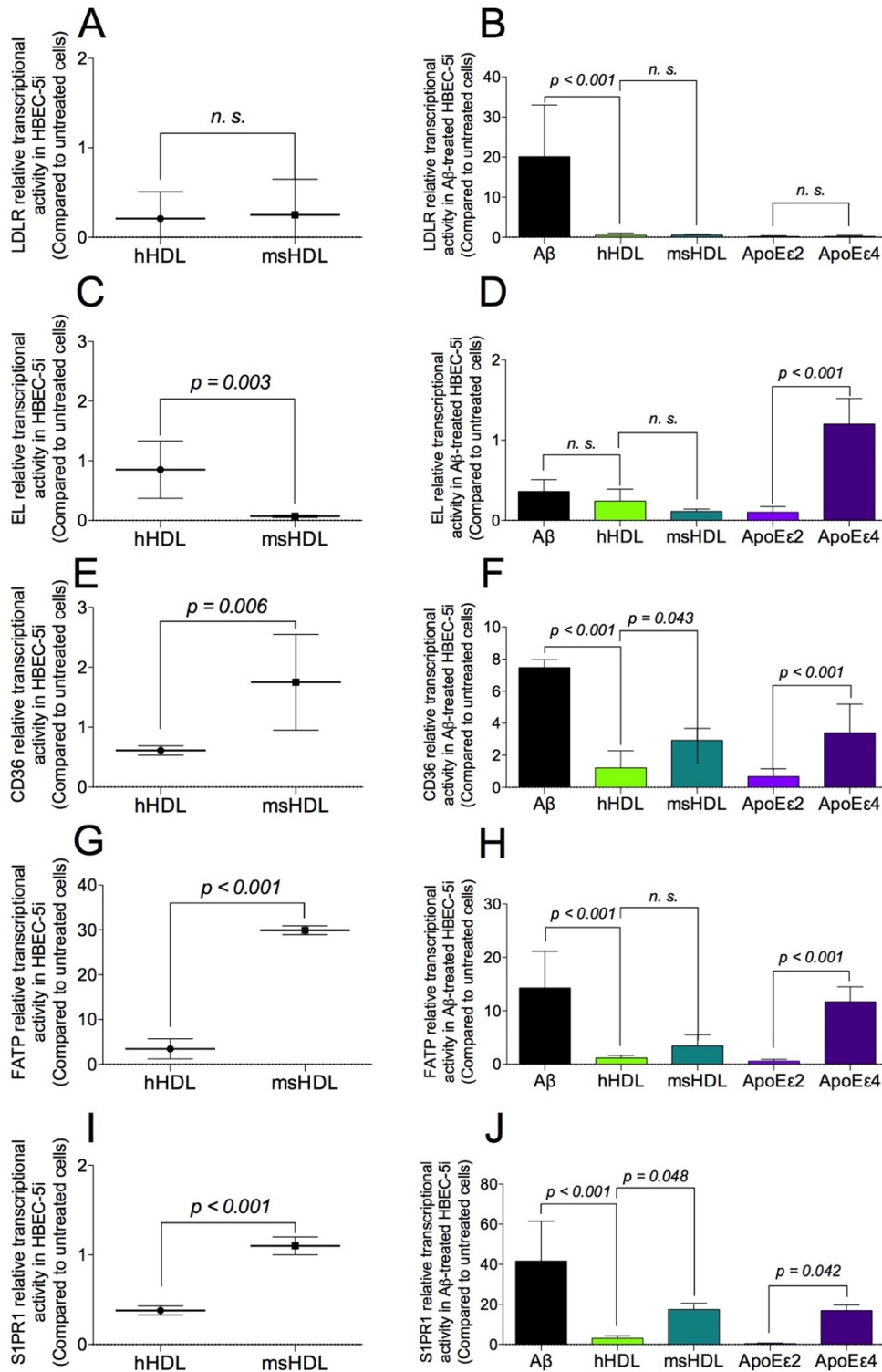


Figura 7. Las gráficas (A, C y E) representan la actividad transcripcional de los genes LDLR (A), EL (C), CD36 (E), FATP (G) y S1PR1 (I) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) en presencia de HDL (300 µg de proteínas/mL) aisladas de sujetos sanos (hHDL) y de pacientes con síndrome metabólico (msHDL). Las gráficas de la derecha representan la actividad transcripcional de los genes LDLR (B), EL (D), CD36 (F), FATP (H) y S1PR1 (J) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) pre-tratadas (1 h) con Aβ₁₋₄₂ (500nm) en presencia de hHDL, de msHDL, ApoE-ε2 y ApoE-ε4 (10 µg de proteína/mL). Los valores representan las medias aritméticas ± la desviación estándar (*n* = 6).

Sin embargo, se observó que tras pre-tratamiento con $A\beta_{1-42}$, la exposición a las HDL y a ApoE disminuyó la expresión del LDLR (Fig. 7B). La expresión de EL disminuyó significativamente tras la exposición a msHDL (Fig. 7C, $p = 0.003$), y aumentó de forma significativa tras la exposición a ApoE- $\epsilon 4$ en comparación a ApoE- $\epsilon 2$ (Fig. 7D, $p < 0.001$). La actividad transcripcional de CD36 (Fig. 7E), FATP (Fig. 7G) y S1PR1 (Fig. 7I) aumentó significativamente tras la exposición a msHDL ($p = 0.006$, $p < 0.001$, y $p < 0.001$, respectivamente). En el contexto de la EA, la expresión de los genes CD36 (Fig. 7F), FATP (Fig. 7H) y S1PR1 (Fig. 7J) se ve reducida tras la exposición con hHDL ($p < 0.001$). En comparación con hHDL, las msHDL aumentaron la expresión de CD36 y S1PR1 ($p = 0.043$ y $p = 0.048$, respectivamente). Finalmente, cabe destacar que CD36 ($p < 0.001$), FATP ($p < 0.001$) y S1PR1 ($p = 0.042$) aumentaron de forma significativa tras la exposición a ApoE- $\epsilon 4$ en comparación a ApoE- $\epsilon 2$.

Por último, se analizó la expresión de dos moléculas de adhesión, VCAM1 e ICAM1 (Figura 8).

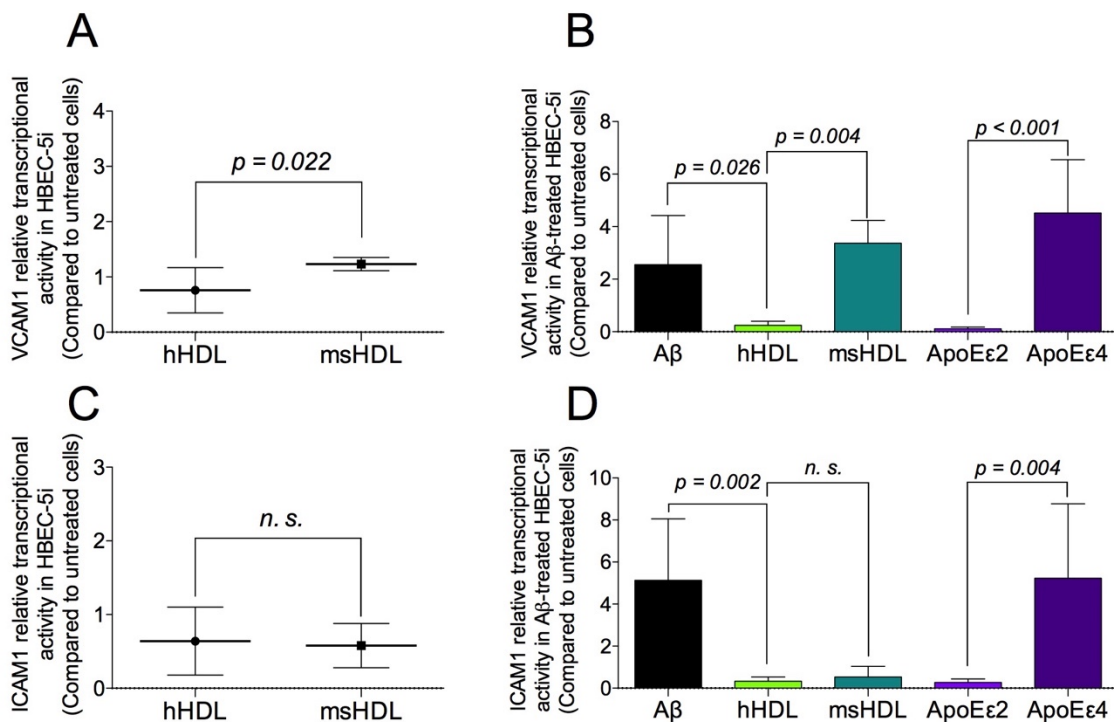


Figura 8. Las gráficas (A y C) representan la actividad transcripcional de los genes VCAM1 (A) e ICAM1 (C) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) en presencia de HDL (300 μg de proteínas/mL) aisladas de sujetos sanos (hHDL) y de pacientes con síndrome metabólico (msHDL). Las gráficas B y D representan la actividad transcripcional de los genes VCAM1 (B) e ICAM1 (D) en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) pre-tratadas (1 h) con $A\beta_{1-42}$ (500nm) en presencia de hHDL, de msHDL, ApoE- $\epsilon 2$ y ApoE- $\epsilon 4$ (10 μg de proteína/mL). Los valores representan las medias aritméticas \pm la desviación estándar ($n = 6$).

En la actividad transcripcional relativa a VCAM1 se observó un aumento significativo de su expresión tras la exposición a msHDL en comparación a lo sucedido tras la exposición a hHDL (Fig. 8A, $p = 0.022$). El tratamiento con $A\beta_{1-42}$ indujo un aumento en la expresión de VCAM1 (Fig. 8B) e ICAM1 (Fig. 8D), este aumento fue silenciado tras la exposición a hHDL ($p = 0.026$ y $p = 0.002$, respectivamente). Además, en comparación con las hHDL, las msHDL aumentaron significativamente la expresión de VCAM1 ($p = 0.004$). Por último, ApoE- $\epsilon 4$ produjo un aumento significativo de la expresión de estas moléculas de adhesión comparado con el efecto producido por la isoforma $\epsilon 2$ ($p = 0.001$ y $p = 0.004$, respectivamente).

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado el efecto de las HDL de sujetos sanos y pacientes con MetS sobre células humanas de microvasculatura cerebral estimuladas con A β y utilizando como control tratamientos con ApoE en sus isoformas ϵ 2 y ϵ 4. La expresión de genes pro-inflamatorios como TNF α , IL-1 β e IL-6 mostraron un ligero aumento tras la exposición con msHDL, llegando a ser significativo para el caso de la IL-6. La neuroinflamación característica en este tipo de patologías neurodegenerativas es inducida por la expresión de citoquinas proinflamatorias. De hecho, se ha demostrado que la IL-1 β y la IL-6 promueven la neuroinflamación estimulando la translocación de HDL a través de la BHE mediante el aumento de expresión de la enzima EL. Para proteger al cerebro frente a la presencia de A β , se observó que en presencia de ApoE- ϵ 4 estas citoquinas pro-inflamatorias experimentaron un aumento significativo de su expresión, confirmando el papel de la isoforma ϵ 4 como factor de riesgo en la EA (Robert et al. 2013; Gómez-Apo et al. 2021).

En cuanto a los transportadores dependientes de ATP se observó que su expresión en las células HBEC-5i era menor tras la exposición a msHDL, llegando a ser significativa para ABCA1. Este tipo de transportadores, mantienen gradientes para moléculas orgánicas, metabolitos y nutrientes a través de la BHE protegiendo así al SNC. La expresión débil de este tipo de transportadores implica la pérdida de la integridad del sistema de microvascular que adapta el flujo sanguíneo a las necesidades de los tejidos y por tanto, los organismos que presentan una reducción de en la expresión de este tipo de enzimas son más propensos a padecer alteraciones metabólicas (Elali et al. 2011). De hecho, el receptor ABCA1 reconoce las HDL en la membrana plasmática y cataliza el eflujo de colesterol de la célula, y la deficiencia de este tipo de receptor en la BHE está asociada a una desregulación del flujo de colesterol, una disminución del aclaramiento de A β , así como a una mayor expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias (Grao-Cruces et al. 2022). En las muestras estimuladas con A β se observó que la expresión de este tipo de transportadores disminuye. Hay muchos estudios realizados en modelos transgénicos de la EA que han demostrado que los transportadores ABC podrían estar implicados en la neurodegeneración. Por un lado, la desregulación del transportador ABCA1 da lugar a trastornos degenerativos cerebrales, debido a que presentan una importante función en el mantenimiento de una correcta y equilibrada concentración de colesterol en el SNC. Por otro lado, el gen ABCB1 codifica para la glucoproteína-P (P-gp) que se encarga de eliminar metabolitos tóxicos del SNC y su disminución reduce el aclaramiento de A β , ya que ABCB1 participa en la eliminación de A β impidiendo el aclaramiento de A β mediado por LRP1 (Behl et al. 2021). En cuanto al receptor SR-BI, no ha mostrado diferencias significativas en ninguna condición. Se sabe que este tipo

de receptor interviene en la adhesión de la microglía a A β y que regula la patología relacionada con A β y la angiopatía amiloide cerebral en un paciente con enfermedad de Alzheimer (Thanopoulou et al. 2010).

En el presente estudio observamos que la expresión del receptor LRP1 disminuyó significativamente en células HBEC-5i tras la exposición con msHDL y aumentadas en células tratadas con A β y expuestas a hHDL y ApoE- ϵ 2. LRP1 es un receptor de ApoE y media la internalización de A β soluble en la BHE. Los pericitos asociados a la BHE eliminan los agregados de A β mediante un mecanismo específico de la isoforma ApoE- ϵ 4 dependiente de LRP1 (Ma et al. 2018). Se cree que la deficiencia neuronal de LRP1 también previene la agregación de A β relacionada con apoE- ϵ 4 en una fase temprana. A edades más avanzadas, la deficiencia neuronal de LRP1 puede acelerar el depósito de A β independientemente de la ApoE- ϵ 4 (Tachibana et al. 2019). Es por ello que, su expresión disminuyó en ApoE- ϵ 4 que es la isoforma que más A β acumula, mientras que en las células expuestas a las hHDL y ApoE- ϵ 2 mostraron mayor expresión de LRP1, por lo tanto, menos riesgo a sufrir EA.

Posteriormente, se analizó la expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo lipídico. Genes estudiados como CD36, FATP y S1PR1 mostraron una mayor expresión en células HBEC-5i expuestas a msHDL así como tras el tratamiento con A β . Este comportamiento fue significativamente disminuido con la exposición a hHDL. El receptor CD36 se encarga de captar los ácidos grasos y se ha visto que su deficiencia está asociada a una captación defectuosa de ácidos grasos por el corazón, el músculo y los tejidos adiposos. El receptor FATP facilita la acumulación de TGA en las células (Abumrad et al. 2021). S1PR1 se encarga del transporte de los esfingolípidos y se ha visto que una reducción de su expresión altera la degradación de fragmentos amiloidogénicos C-terminal en los lisosomas y disminuye la actividad de la γ -secretasa, reduciendo así la amiloidogénesis. Por otro lado, la EL mostró una reducción en su expresión tras el tratamiento con msHDL, ya que se trata de una enzima que incrementa la capacidad antioxidante y vasoprotectora de las moléculas de HDL, necesaria en condiciones patológicas (Schilcher et al. 2019).

Por último, se analizaron dos moléculas de adhesión que influyen en la permeabilidad de la BHE, ICAM1 y VCAM1. Se ha demostrado que con la aparición de estímulos proinflamatorios aumentan su expresión; es decir, estas moléculas son reguladas por citoquinas inflamatorias como la IL-6 y IL-1- β (Ruiz et al. 2017). Por ello, presentan la misma actividad transcripcional que los genes inflamatorios que hemos estudiado en nuestro trabajo, aumentando su expresión en presencia de msHDL y tras la estimulación con A β .

En resumen, podemos decir que los genes inflamatorios, las moléculas de adhesión y los genes implicados en el metabolismo lipídico han visto aumentada su expresión en condiciones de síndrome metabólico ya que su expresión ha provocado desequilibrio lipídico, mientras que los transportadores tipo ABC y LRP1 han disminuido su expresión impidiendo el correcto flujo de colesterol y aclaramiento de A β . Del mismo modo, en condiciones de EA, es decir, tras la estimulación con A β , hemos observado que los genes inflamatorios, las moléculas de adhesión y los genes implicados en el metabolismo lipídico han sufrido un aumento en su expresión, alcanzado en algunos de ellos su máximo punto de expresión en presencia de ApoE- ϵ 4.

6. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo las siguientes conclusiones obtenidas son:

1. Las HDL aisladas de pacientes con síndrome metabólico sobre células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) provocan un aumento de la expresión de genes inflamatorios, moléculas de adhesión y genes implicados en el metabolismo lipídico.
2. Las HDL aisladas de pacientes con síndrome metabólico sobre células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) producen una disminución de la expresión de genes relacionados con el aclaramiento de A β tales como ABCA1 y LRP1.
3. La isoforma ApoE- ϵ 4 produjo un efecto en células de microvasculatura cerebral humana (HBEC-5i) similar al producido por la exposición a HDL aisladas de pacientes con síndrome metabólico.

Aunque es necesario un mayor estudio del efecto de la composición y la funcionalidad de las HDL sobre las células de microvasculatura cerebral humana, los presentes resultados muestran que en el contexto del síndrome metabólico y de la EA, las HDL se vuelven disfuncionales induciendo un ambiente proinflamatorio y contribuyendo a la disminución del aclaramiento de A β mediado por los transportadores ABC. Con todo ello, se abre un nuevo campo de investigación en el que el remodelado de las HDL mediante farmacoterapia o intervención nutricional puede suponer una mejora en la prevención y/o progresión de la EA.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abumrad, N. A., Cabodevilla, A. G., Samovski, D., Pietka, T., Basu, D., y Goldberg, I. J. (2021). Endothelial Cell Receptors in Tissue Lipid Uptake and Metabolism. *Circulation Research*, 128(3), 433–450.
- Behl, T., Kaur, I., Sehgal, A., Kumar, A., Uddin, M. S., y Bungau, S. (2021). The Interplay of ABC Transporters in A β Translocation and Cholesterol Metabolism: Implicating Their Roles in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 58(4), 1564–1582.
- Claesson-Welsh, L., Dejana, E. y McDonald, D.M. (2020). Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends in Molecular Medicine*, 27, 314–331.
- Cortes-Canteli M. y Iadecola C. (2020). Alzheimer's Disease and Vascular Aging: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology*, 3;75(8):942-951.
- Dal Magro, R., Simonelli, S., Cox, A., Formicola, B., Corti, R., Cassina, V., ... Grasso, G. (2019). The Extent of Human Apolipoprotein A-I Lipidation Strongly Affects the β -Amyloid Efflux Across the Blood-Brain Barrier in vitro. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1–15.
- Di Angelantonio, E., Sarwar, N., Perry, P., Kaptoge, S., K. Ray, K., ... Thompson, A. (2009). Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *Journal of the American Medical Association*, 302, 1993–2000.
- Elali, A., y Hermann, D. M. (2011). ATP-binding cassette transporters and their roles in protecting the brain. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 17(4), 423–436.
- Fung, K.Y., Wang, C., Nyegaard, S., Heit, B., Fair, G.D. y Lee, W.L. (2017). SR-BI mediated Transcytosis of HDL in Brain Microvascular Endothelial Cells is independent of caveolin, clathrin, and PDZK1. *Frontiers in Physiology*, 8, 841.
- Gómez-Apo, E., Mondragón-Maya, A., Ferrari-Díaz, M., y Silva-Pereyra, J. (2021). Structural Brain Changes Associated with Overweight and Obesity. *Journal of Obesity*, 6613385.

- Grao-Cruces, E., Lopez-Enriquez, S., Martin, M. E., y Montserrat-de la Paz, S. (2022). High-density lipoproteins and immune response: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 195, 117–123.
- Grao-Cruces, E., Claro-Cala, C. M., Montserrat-de la Paz, S., y Nobrega, C. (2023). Lipoprotein Metabolism, Protein Aggregation, and Alzheimer's Disease: A Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2944.
- Lapergue, B., Moreno, J.-A., Dang, B.Q, Coutard, M., Delbosc, S., Raphaeli, G., ... Michel, J.-B. (2010) Protective effect of high-density lipoprotein-based therapy in a model of embolic stroke. *Stroke*, 41, 1536–1542.
- Lapergue, B., Dang, B.Q., Desilles, J.-P., Ortiz-Munoz, G., Delbosc, S., Loyau, S., ... Michel, J.-B. (2013). High-density lipoprotein-based therapy reduces the hemorrhagic complications associated with tissue plasminogen activator treatment in experimental stroke. *Stroke* 44, 699–707.
- Lochhead, J. J., Yang, J., Ronaldson, P. T., y Davis, T. P. (2020). Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Frontiers in Physiology*, 11, 914.
- Ma, Q., Zhao, Z., Sagare, A. P., Wu, Y., Wang, M., Owens, N. C., ... Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid- β 42 by LRP1-dependent apolipoprotein E isoform-specific mechanism. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 57.
- Ong, K. L., Cochran, B. J., Manandhar, B., Thomas, S., y Rye, K. A. (2022). HDL maturation and remodelling. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(4), 159119.
- Parhizkar, S. y Holtzman, D.M. (2022). APOE Mediated Neuroinflammation and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Seminars in Immunology*, 2022, 59, 101594.
- Paternò, R., Ruocco, A., Postiglione, A., Hubsch, A., Andresen, I., y Lang, M.G. (2004). Reconstituted high-density lipoprotein exhibits neuroprotection in two rat models of

stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 17, 204–211.

Reitz, C., Tang, M.-X., Schupf, N., Manly, J.J., Mayeux, R. y Luchsinger, J.A. (2010). Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 67, 1491–1497.

Robert, J., Button, E.B., Martin, E.M., McAlary, L., Gidden, Z., Gilmour, M., ... Clark, A. (2020). Cerebrovascular amyloid Angiopathy in bioengineered vessels is reduced by high-density lipoprotein particles enriched in Apolipoprotein E. *Molecular Neurodegeneration*, 15, 23.

Robert, J., Osto, E., y von Eckardstein, A. (2021). The Endothelium Is Both a Target and a Barrier of HDL's Protective Functions. *Cells*, 10(5), 1041.

Saczynski, J.S., White, L., Peila, R.L., Rodriguez, B.L. y Launer, L.J. (2007). The relation between apolipoprotein A-I and dementia: The Honolulu-Asia aging study. *American Journal of Epidemiology*, 165, 985–992.

Tachibana, M., Holm, M. L., Liu, C. C., Shinohara, M., Aikawa, T., Oue, H., ... Kanekiyo, T. (2019). APOE4-mediated amyloid- β pathology depends on its neuronal receptor LRP1. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(3), 1272–1277.

Thanopoulou K., Fragkouli A., Stylianopoulou F. y Georgopoulos S. (2010). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(48):20816-21.

Tran-Dinh, A., Diallo, D., Delbosc, S., Varela-Perez, L. M., Dang, Q. B., Lapergue, B.,... Meilhac, O. (2013). HDL and endothelial protection. *British Journal of Pharmacology*, 169(3), 493–511.