

## Transporte del $\beta$ -amilode a través de las barreras cerebrales y su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Ibrahim González-Marrero<sup>1</sup>, Leandro Castañeyra-Ruiz<sup>1,3\*</sup>, María Castañeyra-Ruiz<sup>2</sup>, Juan M González-Toledo<sup>1</sup>, Emilia M Carmona-Calero<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna Tenerife, Islas Canarias, España.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación y Ciencias de Puerto del Rosario, Fuerteventura, Islas Canarias, España

<sup>3</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna Tenerife, Islas Canarias, España.

\*Correspondencia: Leandro Castañeyra-Ruiz, [lcastane@ull.es](mailto:lcastane@ull.es).

Recibido 01-Febrero-2014; revisado 13-Febrero-2014; aceptado 05-Marzo-2014

### Summary

$\beta$ -amyloid transport through the brain barrier and its possible role in the development of Alzheimer's disease.

The clearance of  $\beta$ -amyloid, through its accurate metabolism in the brain, is essential to prevent neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). Thus, it is postulated that a defective  $\beta$ -amyloid clearance by brain barriers, both the blood-brain barrier (BBB) and the blood-cerebrospinal fluid (BCSFB) barrier, could be an important factor in the onset and development of AD. The  $\beta$ -amyloid ( $\beta$ A) located in the interstitial fluid (IF) can pass to the blood through the BBB or passively move to LCR where  $\beta$ A is kidnapped by the choroid plexus from CSF into the blood. It is proposed that the cause of most cases of sporadic AD (late onset), may be due to improper clearance of  $\beta$ -amyloid in the brain, so that dementia in AD could be associated with the brain barrier disorder, leading to the accumulation of  $\beta$ -amyloid on blood vessels, the brain parenchyma, and extracellular and intraneuronal form deposits.

### Key words

$\beta$ -amyloid, brain barriers, Alzheimer disease.

### Resumen

Transporte del  $\beta$ -amilode a través de las barreras cerebrales y su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

La eliminación del  $\beta$ -amilode, mediante su adecuado metabolismo en el cerebro, es esencial para evitar patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA). De tal manera, que se postula, que un aclaramiento deficiente  $\beta$ -amilode a través de las barreras cerebrales, tanto por la barrera hemato-encefalica (BHE) como por la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR), podría ser un factor importante en el inicio y desarrollo de la EA. El  $\beta$ -amilode localizado en el

fluido intersticial puede pasar a la sangre a través de la BHE o pasar pasivamente al LCR donde es secuestrado por el plexo coroideo y de ahí pasa a la sangre. Se propone, que la causa de la mayoría de los casos esporádicos de la EA (de aparición tardía), pueden ser debidos al incorrecto aclaramiento de  $\beta$ -amilode del cerebro, por lo que, la demencia en la EA se podría asociar con el trastorno de las barreras cerebrales, lo que conduce a la acumulación de  $\beta$ -amilode en los vasos sanguíneos, el parénquima cerebral y formar depósitos extracelulares e intraneuronales.

### Palabras clave

$\beta$ -amilode, barreras cerebrales, enfermedad de Alzheimer.

### Introducción

El péptido  $\beta$ -amilode que se encuentra en el encéfalo es generado por endoproteólisis de la glicoproteína de membrana PPA (proteína precursora amiloidea) tipo I, llevada a cabo por las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  [54,67]. Este procesamiento puede tener lugar por dos vías diferentes: una vía no amiloidótica donde la proteólisis por la  $\alpha$ -secretasa origina como producto sustancias solubles [27], y otra vía amiloidótica en la cual la proteólisis por la  $\beta$ -secretasa seguida de la  $\gamma$ -secretasa da lugar al péptido amiloide. Estas proteólisis dan como resultado la formación de isoformas de 40 aminoácidos ( $\beta$ A 1-40) y en menor medida de isoformas de 42 aminoácidos ( $\beta$ A 1-42) [27]. Una proporción significativa de  $\beta$ -amilode procede de fuera del cerebro, principalmente de las plaquetas y los vasos cerebrales, que pueden reabsorber  $\beta$ -amilode del plasma a través de la RAGE (receptor para productos finales de glicosilación avanzados) y pasar al cerebro [59].

Este péptido amiloide puede ser eliminado del cerebro; a través de los capilares, por degradación enzimática o pasando al líquido cefalorraquídeo

[63].  $\beta$ A 1-40 y  $\beta$ A 1-42 son catabolitos fisiológicos de la proteína precursora de amiloide, la cual se expresa en muchos tejidos y en particular en astrocitos, neuronas y plaquetas. Estos monómeros ( $\beta$ A1-40 y  $\beta$ A1-42) no son neurotóxicos y se encuentran en el plasma, LCR y fluido intersticial [16,50]. Por lo tanto, el  $\beta$ A se elimina de varias formas [63]: 1ª-puede ser reabsorbido en los vasos cerebrales por dos transportadores, P-gp (P-glicoproteína) y LRP-1 (receptor de lipoproteína de baja densidad), situados en la zona luminal y abluminal del endotelio cerebral respectivamente [14]; 2ª- el  $\beta$ A puede ser localmente degradado por varias enzimas: la neprilisina, la enzima degradadora de insulina, enzima convertidora de endotelina 1 y 2 y las matriz-metaloproteinasas (MMP) 2, 3 y 9; y 3ª- el  $\beta$ A puede pasar al LCR donde forma complejos con la apolipoproteína-J,  $\alpha$ -2-macroglobulina, y/o transtirretina que transportan el  $\beta$ A a los plexos coroideo a través de los receptores megalina (LRP-2) y LRP1, donde complejos son transportados a la sangre o degradados en el propio plexo coroideo, de esta forma, el plexo coroideo elimina del 10 al 15% de  $\beta$ -amiloide [63].

Mawuenyega y colaboradores [45] han medido la producción y el aclaramiento de  $\beta$ A en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) y en pacientes cognitivamente normales, concluyendo que los depósitos de amiloide se deben principalmente más a una disminución del aclaramiento de  $\beta$ A que a su sobre-producción [45]. En esta revisión se pretende hacer un análisis de las vías metabólicas del  $\beta$ A con especial énfasis a su transporte a través de las barreras cerebrales.

**Desarrollo**

*$\beta$ -amiloide.*

El  $\beta$ A es un producto del metabolismo de la proteína precursora amiloidea (PPA) en todas las células estudiadas hasta la fecha. Tiene entre 665 y 770 aminoácidos, contiene un extremo amino-terminal, un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un extremo intracitoplásmico. Su función en el organismo no es bien conocida, pero se piensa que puede intervenir en funciones de adhesión celular, regulación de membranas basales y activación de citocinas, así como lugares de unión a zinc y a cobre, pudiendo tener propiedades antioxidantes y de protección frente a tóxicos externos; también se piensa que tiene un papel importante en la maduración del sistema nervioso central, la reparación y la plasticidad sináptica [25,50].

Hipótesis amiloidea o de la cascada del  $\beta$ A en la enfermedad de Alzheimer (EA)(Fig.1).

La hipótesis de la cascada  $\beta$ A surge como una posible explicación al desarrollo de la enfermedad. Cambios graduales en los niveles de estado estacionario de la proteína  $\beta$ A en el cerebro, inician

la cascada amiloide [21,23,54-56]. Los niveles de  $\beta$ A puede ser elevados por una mayor producción y / o reducción del aclaramiento del mismo. En particular, la relación puede ser  $\beta$ A42/ $\beta$ A40 aumentada por mutaciones en tres genes diferentes (proteína precursora del  $\beta$ -amiloide (APP), presenilina-1 (PS1) y PS2) que causan formas familiares de la enfermedad de Alzheimer.

Este aumento relativo de la  $\beta$ A42 favorece la formación de oligómeros, lo que provoca en principio sutiles cambios de la función sináptica, que luego se vuelven cada vez más graves y permanentes. Al mismo tiempo las formas  $\beta$ A42 se hacen visibles al microscopio como depósitos en el parénquima cerebral, en principio como placas difusas (no fibrilares). A medida que las placas difusas comienzan a adquirir las fibrillas de  $\beta$ A, se observan respuestas inflamatorias locales (microgliosis y astrocitosis). Con el tiempo, estos cambios dan como resultado estrés oxidativo, alteración de la homeostasis iónica (por ejemplo, calcio) y una serie de adicionales cambios bioquímicos. Los ovillos neurofibrilares son inducidos por alteración de la actividad de quinasas y fosfatasas y contribuye a defectos en el transporte axonal. La cascada culmina en la disfunción sináptica neuronal generalizada y la muerte celular, lo que aumenta la demencia asociada a la acumulación de  $\beta$  y patología tau. Sin embargo, esta hipótesis de la cascada de  $\beta$ A representa una pequeña cantidad (<1%) de los casos de EA, Alzheimer familiar (inicio temprano), está relacionada con mutaciones genéticas que están asociadas con un aumento de la producción de  $\beta$ A[54].



Fig.1: Esquema de la hipótesis amiloidea según. Haass y Selkoe 2007 [21].

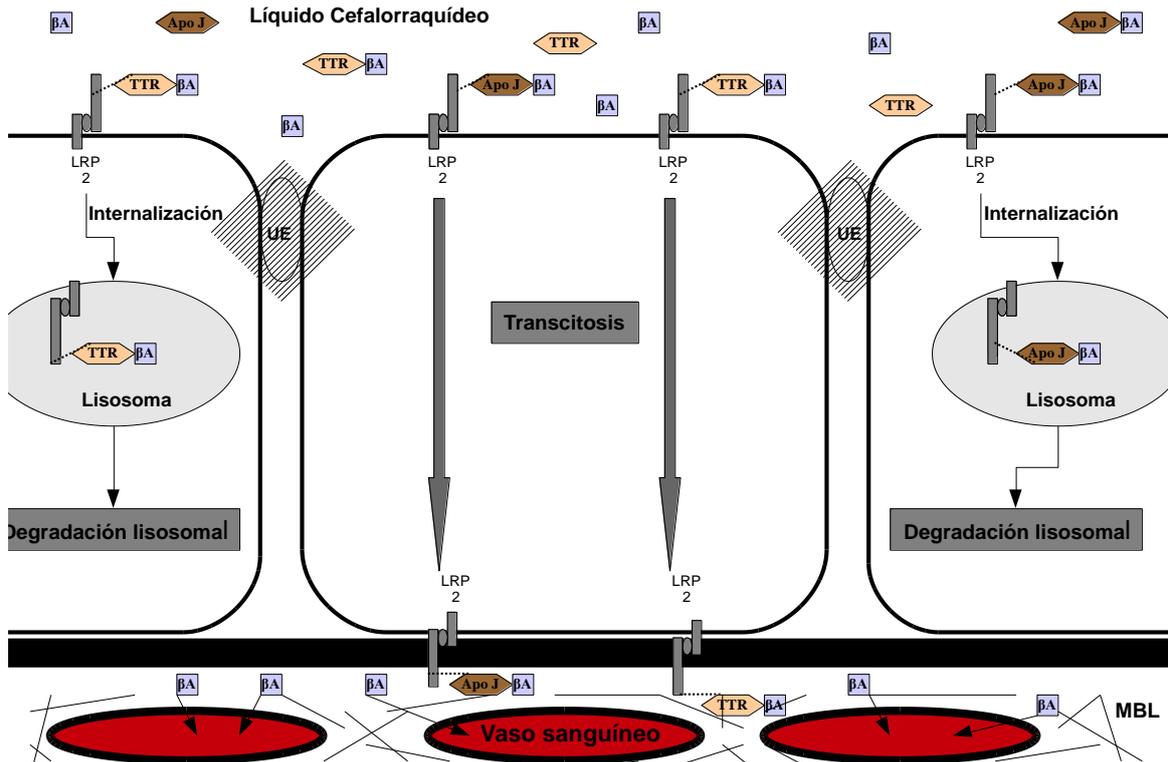


Fig. 2: Mecanismo propuesto para el transporte y degradación del  $\beta$ -amiloide por el plexo coroideo a través del receptor megalina o LRP-2. Abreviaturas: TTR: transtiretina,  $\beta$ A:  $\beta$ -amiloide, Apo J: Apolipoproteína J, MBL: membrana basolateral, UE: uniones estrechas.

*$\beta$ -amiloide intraneuronal.*

Se ha observado que el  $\beta$ -amiloide también puede encontrarse intracelularmente en cantidades que resultan tóxicas. Diferentes estudios encontraron que existe una acumulación intracelular previa al depósito extracelular en forma de oligómeros o prefibrillas, lo cual ha hecho que cada vez sea mayor el número de investigadores que postulan que el péptido también ejerce su efecto tóxico desde el interior [71]. El mecanismo por el cual resulta tóxico en el interior de la célula no está claro, aunque existen evidencias de que podría producir muerte neuronal por apoptosis [2,66]. En estudios sobre el papel del péptido amiloide intraneuronal se ha demostrado que contribuye a la patología de la EA facilitando la hiperfosforilación de tau, impidiendo la correcta función de la mitocondria y el proteosoma y desencadenando dishomeostasis del calcio y pérdida de las sinapsis nerviosas [43]. En estudios con ratones transgénicos 3xTgAD se han visto alteraciones cognitivas y no cognitivas asociadas a demencia a edades tempranas en las que sólo se detecta  $\beta$ -amiloide intraneuronal [17].

*Aclaramiento del  $\beta$ -amiloide por las barreras cerebrales.*

Diferentes autores postulan, que un aclaramiento deficiente  $\beta$ -amiloide a través de las barreras cerebrales, tanto por la barrera hemato-encefalica (BHE) como por la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR), podría ser un factor

importante en el desarrollo de la EA. El  $\beta$ -amiloide secretado al fluido intersticial puede pasar a la sangre a través de la BHE o pasar pasivamente al LCR donde es secuestrado por el plexo coroideo (Fig. 1,2) [10] y de ahí pasa a la sangre. Zlokovic propone que la causa de la mayoría de los casos esporádicos de la EA (de aparición tardía), pueden ser debidos al incorrecto aclaramiento de  $\beta$ -amiloide del cerebro [24,63,74,77]. En este nuevo concepto, la demencia en la EA se asocia con el trastorno cerebrovascular [12,74,77], lo que conduce a la acumulación de  $\beta$ -amiloide en los vasos sanguíneos (angiopatía amiloide cerebral) y en el parénquima cerebral, depósitos extracelulares [13,22,74,77] y lesiones intraneuronales (ovillos neurofibrilares) [3].

*Regulación de la concentración de  $\beta$ A en el SNC*

En el líquido intersticial del cerebro normal, la concentración de  $\beta$ -amiloide es rigurosamente regulada de las siguientes formas: a-por su tasa de producción de la proteína precursora de amiloide (PPA), b-por la entrada en el cerebro a través de la BHE, principalmente por los receptores de productos de glicación avanzada (RAGE) [12], c-por su rápida eliminación en la BHE a través del receptor de lipoproteína de baja densidad 1 (LRP1) [11-14,58], d-por la degradación enzimática en el cerebro (Selkoe y cols., 2005) y e-por difusión al LCR donde es secuestrado por el plexo coroideo (Fig.4) [10].

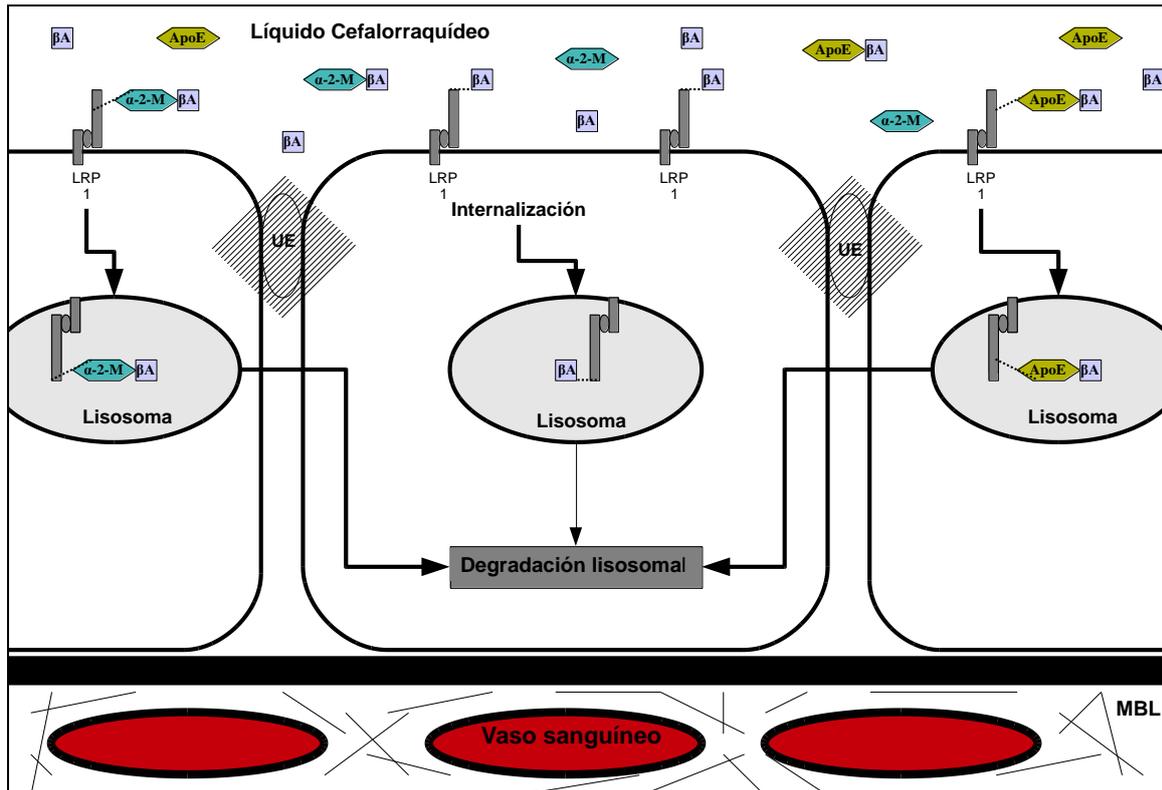


Fig. 3: Mecanismo propuesto para la degradación del  $\beta$ -amiloide en el plexo coroideo a través del receptor LRP-1. Abreviaturas: TTR: transtirretina,  $\beta$ A:  $\beta$ -amiloide, Apo J: Apolipoproteína J, MBL: membrana basolateral, UE: uniones estrechas.

El RAGE (receptor para productos finales de glicación avanzada) es un receptor de transmembrana de 35 kD de la inmunoglobulina, que se localiza en el endotelio de los vasos cerebrales en la BHE y que facilita la entrada en el cerebro del  $\beta$ A, está incrementada en los modelos animales de la EA y en pacientes con la enfermedad. Además, la expresión de LRP-1 en la BHE está reducida haciendo desfavorable el aclaramiento de  $\beta$ -amiloide desde el cerebro. Estos dos hechos; el aumento de la RAGE y la disminución LRP1 puede conducir a la acumulación de  $\beta$ -amiloide en el cerebro y su progresiva oligomerización y aumentar los niveles de oligómeros de  $\beta$ -amiloide neurotóxicos [39,44,69]. Por lo tanto, es muy importante la eliminación continua de  $\beta$ -amiloide del cerebro a través de la BHE y la BSLCR y el metabolismo esencial para evitar su acumulación potencialmente neurotóxica[74].

Según Crossgrove y cols. [10] el plexo coroideo es capaz de captar los complejos de  $\beta$ A con Apo J, TTR y APOE desde el LCR, por lo tanto, el plexo coroideo es una estructura a tener en cuenta en el estudio de los mecanismos del aclaramiento del  $\beta$ -amiloide. Crossgrove y colaboradores demostraron que el plexo coroideo rompe el  $\beta$ -amiloide en fragmentos más pequeños que posteriormente acumula [10]. Este hallazgo concuerda con otros

informes que indican que el  $\beta$ -amiloide permanece casi intacto después de una inyección en el LCR ventricular, pero que se degrada parcialmente durante o después del paso a la sangre [18].

En las ratas, el aclaramiento de péptido  $\beta$ -amiloide inyectado intra-ventricularmente disminuye de 10,4  $\mu$ l / min a los 3 meses de edad a 0,71  $\mu$ l / minuto a los 30 meses, en consecuencia, el contenido en el cerebro del péptido amiloide aumenta del 7% después de la perfusión de  $\beta$ -amiloide en el LCR en las ratas jóvenes y un 49% en los animales viejos [52]. El aumento de los niveles de péptido  $\beta$ -amiloide en los humanos adultos, también podría estar relacionado con la disminución de su aclaramiento del cerebro. Asimismo, la disminución del volumen de reabsorción del LCR, el aumento de proteoglicanos y la disminución del aclaramiento del  $\beta$ -amiloide, podría inducir la formación y retención de oligómeros neurotóxicos [57]. Como hemos visto, numerosas publicaciones describen las rutas de aclaramiento de  $\beta$ -amiloide con especial énfasis en el aclaramiento vascular. Aunque el aclaramiento a través de la BHE hacia la sangre del  $\beta$ -amiloide parece ser el mecanismo más importante en el mantenimiento de sus niveles, otros datos sugieren un papel importante del plexo coroideo del transporte del  $\beta$ -amiloide a través de la BSLCR [6,10,19-21,59,75].

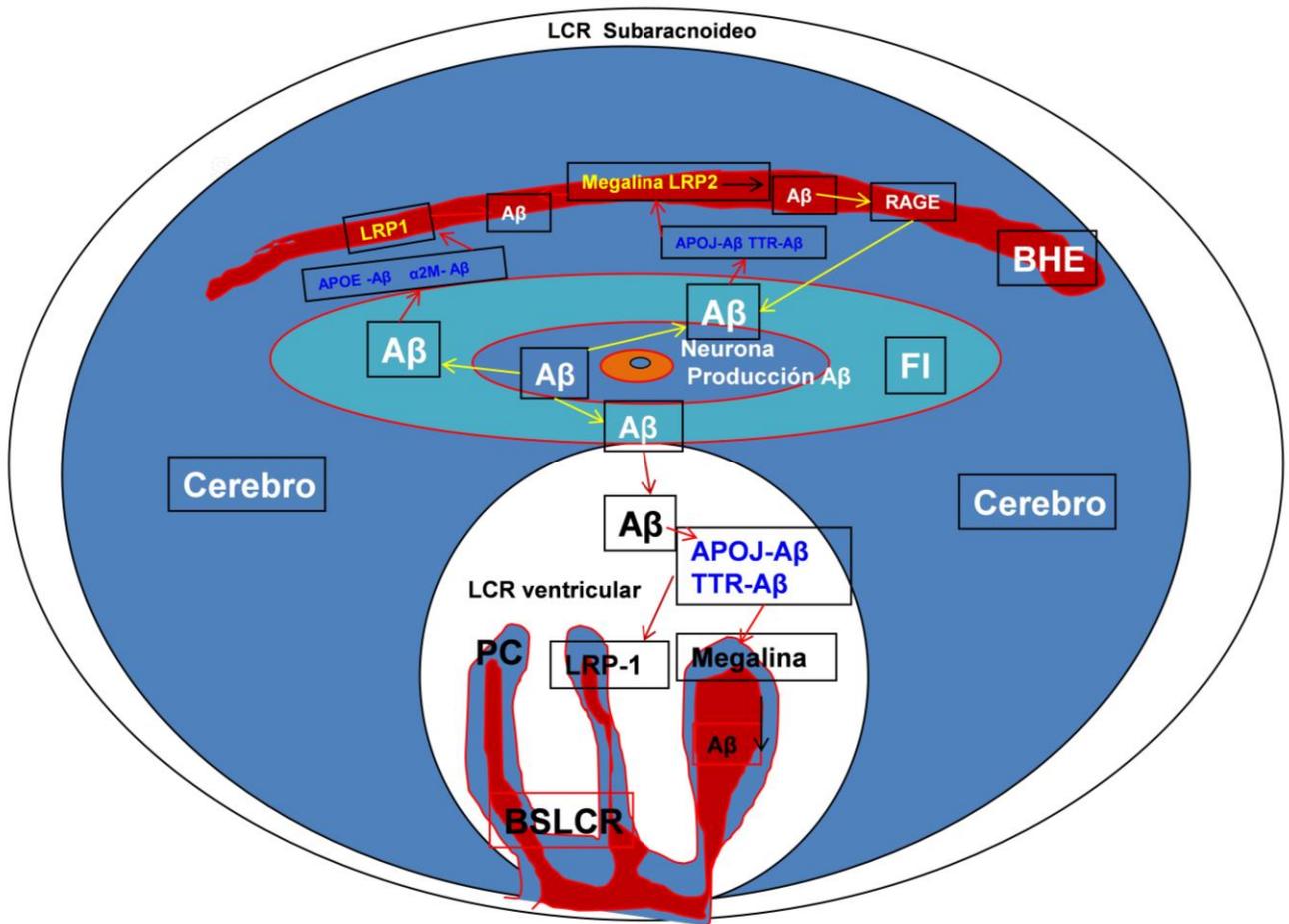


Fig. 4: Esquema de los mecanismos que regulan la concentración  $\beta$ -amiloide en el SNC.

Incremento del  $\beta$ A flechas amarillas. Disminución flechas rojas.

TTR: transtirretina.;  $\beta$ -amiloide, Apo J: Apolipoproteína J, Apo E: Apolipoproteína E, LRP-1 receptor, : LCR: Líquido cefalorraquídeo LRP-2: receptor (megalina), BHE: barrera hematoencefalica, FI= fluido intersticial, BSLCR: barrera sangre-líquido cefalorraquídeo, RAGE: receptor.

La cantidad de  $\beta$ A en el SNC estas regulada por los siguientes mecanismos: a) un aumento de su producción en la neurona, b-por la entrada en el cerebro a través de la BHE, principalmente por los receptores de productos de glicación avanzada (RAGE) y c- El  $\beta$ A se elimina a través de la BHE y la BSLCR donde intervienen los transportadores APOE,  $\alpha$ 2M, APOJ y TTR y los receptores LRP1 y Megalina (LRP2).

Varios estudios han demostrado, utilizando un sistema “transwell”, la direccionalidad de la captación de  $\beta$ -amiloide por el plexo coroideo, en esos casos, se observó que el transporte se producía desde el polo apical (orientado al LCR) hacia el polo basal (orientado hacia la membrana basolateral) [5,6,7,10,61,73]. Los resultados del grupo de Carro [6,7] apoyan la posibilidad de la existencia de un aclaramiento defectuoso de  $\beta$ -amiloide en el plexo coroideo, el cual contribuye al desarrollo de la amiloidosis en la enfermedad de Alzheimer [4]. Estos resultados también apoyan que en el plexo coroideo (PC) no patológico, el  $\beta$ -amiloide es eliminado desde el LCR, lo que confirma la ruta a través de la barrera sangre-LCR en el mantenimiento de la homeostasis del  $\beta$ -amiloide en el cerebro (Fig.4) [6,7].

Existen dos receptores implicados en el aclaramiento de  $\beta$ -amiloide en el plexo coroideo: megalina o LRP-2 y LRP-1.

#### *Papel de la megalina (LRP-2) en el aclaramiento del $\beta$ -amiloide.*

La megalina es una proteína transmembrana de 550-600 kDa, también conocida como LRP-2 y glicoproteína 330, es el miembro más grande de los receptores de la familia de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) [29,46]. La megalina es una proteína multifuncional implicada en la señalización celular y en endocitosis mediada por receptores [8,26,49].

En el sistema nervioso, la megalina fue descrita por primera vez en los capilares cerebrales, aunque también se encuentra en el revestimiento endotelial de las paredes ventriculares y el plexo coroideo [9,41,72,73]. La megalina se une e internaliza una amplia variedad de ligandos, incluyendo las lipoproteínas, hormonas, vitaminas y proteínas como la TTR y Apo J [26,48]. En el cerebro, la megalina participa en la endocitosis y en

el transporte de complejos de  $\beta$ -amiloide a través de la BHE y de la BSLCR en el plexo coroideo (Fig.1 [6,21,74-77]).

Hammad y colaboradores [21] han propuesto que el epitelio del plexo coroideo está implicado en el aclaramiento del  $\beta$ -amiloide y la degradación enzimática de éste, mediada por la megalina. Utilizando cultivos celulares, que expresan altos niveles de megalina, demostraron que complejos ApoJ- $\beta$ -amiloide entran por endocitosis y posteriormente son degradados lisosomalmente. Mientras que el  $\beta$ -amiloide sin formar complejos no fue interiorizado por las células, indicando que la formación del complejo ApoJ- $\beta$ -amiloide es crucial para el aclaramiento mediado por la megalina [21]. Se ha encontrado una reducción de la expresión megalina durante el envejecimiento en roedores normales [6], en ratones con mutaciones APP/PS1[6,15] y en pacientes con la enfermedad de Alzheimer [15]. Las ratas adultas y ratones APP/PS1 presentan una disminución de la expresión de megalina en el plexo coroideo, acompañada de un aumento significativo en los niveles de  $\beta$ -amiloide en el cerebro, probablemente causado por una disminución en el aclaramiento por bajos niveles de transportadores de  $\beta$ -amiloide en el cerebro como albúmina, transtirretina y Apo J[6].

*Papel del LRP-1 en el aclaramiento del  $\beta$ -amiloide.*

El LRP-1 (proteína receptora de lipoproteínas de baja densidad) es una glicoproteína transmembrana de 600 kDa, está implicada en la endocitosis mediada por receptor y la señalización celular [28]. El LRP-1 se sintetiza como un precursor de un solo polipéptido (600 kDa), que se procesa en dos péptidos heterodiméricos [70]. La cadena pesada de LRP-1 (515 kDa), constituye el dominio extracelular y se une de forma no covalente a la cadena ligera transmembrana de 85 kDa con una parte situada en el citoplasma [47]. Es un receptor de endocitosis y la mayoría de sus ligandos son degradados en los lisosomas [42]. El LRP-1 se localiza en la barrera hematoencefálica [15,58] en el plexo coroideo [30-36] y en el hígado [62]. El papel del LRP-1 en el aclaramiento de  $\beta$ -amiloide consiste en el transporte directo desde el LCR al plexo coroideo [15,58] o unirse a proteínas transportadoras de  $\beta$ -amiloide como, la Apo E o la  $\alpha$ 2-macroglobulina [38,40,41,64,65]. También podemos encontrar en la sangre o en el LCR la cadena pesada del LRP-1 en forma soluble (sLRP-1) [77], la cual es liberada de la célula por una beta secretasa (BACE1) [68]. Esta forma soluble de LRP-1 es la proteína presente en sangre con mayor afinidad por el  $\beta$ -amiloide [68], uniéndose entre al 70 y 90 % del  $\beta$ -amiloide que se encuentra en la sangre de humanos y ratones [53].

**Conclusiones**

El aclaramiento de  $\beta$ -amiloide cerebral es un mecanismo muy importante para la prevención de la acumulación neurotóxica  $\beta$ A en el cerebro. La pérdida de integridad neurovascular en la BHE y disrupción de la BSLCR constituyen uno de los factores más importantes en la disminución del aclaramiento de  $\beta$ -amiloide cerebral. Por lo que cambios en la expresión de las proteínas implicadas en el transporte del  $\beta$ -amiloide a través de las barreras cerebrales, podrían ser uno de los factores clave en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA.

**Bibliografía**

1. Alvira-Botero X, Carro EM. Clearance of amyloid-peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Curr Aging Sci* 2010 3, 219-229.
2. Ankarcona M, Winblad B. Biomarkers for apoptosis in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2005;20(2):101-5.
3. Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(9):663-7224.
4. Banks WA, Robinson SM, Verma S, Morley JE. Efflux of human and mouse amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 from brain: impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2003; 121(2): 487-92.
5. Bourasset F, Ouellet M, Tremblay C, Julien C, Do TM, Oddo S, LaFerla F, Calon F. Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2009 Mar;56(4):808-13.
6. Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin like growth factor I. *J Neurosci* 2005; 25(47): 10884-93.
7. Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 2002; 8(12): 1390-7.
8. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(4): 256-66.
9. Chun JT, Wang L, Pasinetti GM, Finch CE, Zlokovic BV. Glycoprotein 330/megalin (LRP-2) has low prevalence as mRNA and protein in brain microvessels and choroid plexus. *Exp Neurol* 1999; 157(1): 194-201
10. Crossgrove JS, Li GJ, Zheng W. The choroid plexus removes beta-amyloid from brain cerebrospinal fluid. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Nov;230(10):771 6.
11. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the

- blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009 8, 16-30.
12. Deane R, Du Yan S, Subramanyam RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):907-13.
  13. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 2008;118(12) 4002–13.
  14. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic Zlokovic BV. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Aβ isoforms. *Neuron* 2004;43(3):333–44.
  15. Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, et al. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* 2008; 29(6): 902-12.
  16. Finder VH, Glockshuber R. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis.* 2007 4, 13-27.
  17. Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, LaFerla FM, Fernández-Teruel A. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(1):125-47. Epub 2006 Oct 20. Review
  18. Ghersi-Egea JF, Gorevic PD, Ghiso J, Frangione B, Patlak CS, Fenstermacher JD. Fate of cerebrospinal fluid-borne amyloid beta-peptide: rapid clearance into blood and appreciable accumulation by cerebral arteries. *J Neurochem* 1996; 67(2): 880-3.
  19. González-Marrero I, Castañeyra-Ruiz L, González-Toledo JM, Castañeyra-Ruiz A, Paz-Carmona H, Ruiz-Mayor L, Castañeyra-Perdomo A, Carmona-Calero EM. High blood pressure effects on the brain barriers and choroid plexus secretion. *Neuroscience & Medicine*, 2012; 3: 60-64.
  20. González-Marrero I, Castañeyra-Ruiz L, González-Toledo JM, Castañeyra-Ruiz A, de Paz-Carmona H, Castro R, Hernandez-Fernaund JR, Castañeyra-Perdomo A, Carmona-Calero EM. High blood pressure effects on the blood to cerebrospinal fluid barrier and cerebrospinal fluid protein composition: a two-dimensional electrophoresis study in spontaneously hypertensive rats. *Int J Hypertens.* 2013;2013:164653
  21. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):101-12. Review
  22. Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 1997; 272(30): 18644-9.
  23. Han BH, Zhou ML, Abousaleh F, Brendza RP, Dietrich HH, Koenigsnecht-Talboo J, Cirrito JR, Milner E, Holtzman DM, Zipfel GJ. Cerebrovascular dysfunction in amyloid precursor protein transgenic mice: contribution of soluble and insoluble amyloid-beta peptide, partial restoration via gamma-secretase inhibition. *J Neurosci* 2008;28(50):13542–50.
  24. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002 297, 353–356.
  25. Holtzman DM. Pittsburgh compound B retention and verification of amyloid deposition. *Arch Neurol.* 2007 Mar;64(3):315-6
  26. Hjälml G, Murray E, Crumley G, Harazim W, Lundgren S, Onyango I. Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur J Biochem* 1996; 239(1): 132-7.
  27. Hoey SE, Williams RJ, Perkinson MS. Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production. *J Neurosci.* 2009 Apr 8;29(14):4442-60.
  28. Hyman B T, Strickland D K, Rebeck G W. Role of the low-density lipoprotein receptor-related protein in beta-amyloid metabolism and Alzheimer disease *Arch Neurol.* 2000;57:646–650.
  29. Jaeger S, Pietrzik CU. Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008; 5(1): 15-25.
  30. Johanson C, McMillan P, Palm D, Stopa E, Doberstein C, Duncan JA: Volume transmission-mediated protective impact of choroid plexus-CSF growth factors on forebrain ischemic injury. In *Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease* Edited by: Sharma H, Westman J. San Diego: Academic Press; 2003:361-384.
  31. Johanson C: The choroid plexus. In *Encyclopedia for Neuroscience Volume 1.* Edited by: Adelman G. Boston: Birkhauser; 1999:384-387.

32. Johanson, C. E. Tissue Barriers: Diffusion, bulk flow and volume transmission of proteins and peptides within the brain. In Audus, K. L., and Raub, T. J. (eds.), *Pharmaceutical Biotechnology 5: Biological Barriers to Protein Delivery*, Plenum, New York, 1993 pp. 467–486.
33. Johanson, C. E. Ventricles and cerebrospinal fluid. In Michael Conn, P. (ed.), *Neuroscience in Medicine*, J. B. Lippincott, Philadelphia, 1995: pp. 171–196.
34. Johanson, C.E., Duncan, J.A.I.I.I., Klinge, P.M., Brinker, T., Stopa, E.G., Silveberg, G.D. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008 5, 10.
35. Johnson KA, Albert MS. Perfusion abnormalities in prodromal ad. *Neurobiol Aging* 2000; 21:289–292.
36. Johnsson P, Lundqvist C, Lindgren A, Ferencz I, Alling C, Stahl E. Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1995 9:694–699.
37. Johnston M, Boulton M, Flessner M: Cerebrospinal fluid absorption revisited: Do extracranial lymphatics play a role? *The Neuroscientist* 2000, 6:77-87.
38. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, Koo EH. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest.* 2000 Nov;106(9):1159-66.
39. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003;300(5618): 486–9.
40. Knauer MF, Orlando RA, Glabe CG. Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res.* 1996 Nov 18;740(1-2):6-14.
41. Kounnas MZ, Haudenschild CC, Strickland DK, Argraves WS. Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo* 1994; 8(3): 343-51.
42. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* 1994;63:601-37.
43. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Jul;8(7):499-509.
44. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;440(7082):352–7.
45. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 2010 330, 1774.
46. May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med* 2007; 39(3): 219-28.
47. Meijer AB, Rohlena J, van der Zwaan C, van Zonneveld AJ, Boertjes RC, Lenting PJ, Mertens K. Functional duplication of ligand-binding domains within low-density lipoprotein receptor-related protein for interaction with receptor associated protein, alpha2-macroglobulin, factor IXa and factor VIII. *Arch Cardiovasc Dis.* 2008 Mar;101(3):181-9.
48. Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 407-28.
49. Müller D, Nykjaer A, Willnow TE. From holoprosencephaly to osteopathology: role of multifunctional endocytic receptors in absorptive epithelia. *Ann Med* 2003; 35(5): 290-299.
50. Ono K, Noguchi M, Matsumoto Y, Yanase D, Iwasa K, Naiki H, Yamada M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes beta-amyloid fibril formation in vitro. *Neurobiol Dis.* 2005 20, 233-240.
51. Panegyres PK. The functions of the amyloid precursor protein gene. *Rev Neurosci.* 2001;12(1):1-39
52. Preston JE. Ageing choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Microsc Res Tech* 2001 52:31–37.
53. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Marky A, Lenting PJ, Wu Z, Zarcone T, Goate A, Mayo K, Perlmutter D, Coma M, Zhong Z, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 2007 Sep;13(9):1029-31.
54. Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 2001;32(2):177–80.
55. Selkoe DJ. Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2005 Feb;62(2):192-5.
56. Selkoe DJ. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med.* 2011 17, 1060-1065.
57. Serot JM, Bene MC, Faure GC. Choroid plexus, ageing of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci* 2003 8:515–521.

58. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV: Clearance of Alzheimer's amyloid ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2000, 106:1489-1499.
59. Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, McGuire D. "Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis," *Lancet Neurology*, 2003 vol. 2, no. 8, pp. 506-511.
60. Silverberg GD, Miller MC, Messier AA, Majmudar S, Machan JT, Donahue JE, Stopa EG, Johanson CE. Amyloid deposition and influx transporter expression at the blood-brain barrier increase in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010 69, 98-108.
61. Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Demonstration of a coupled metabolism efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J Neurosci* 1999; 19(15): 6275-89.
62. Tamaki C, Ohtsuki S, Terasaki T. Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide (1-40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 2007 Oct;72(4):850-5.
63. Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: The many roads to perdition. *Neuron* 2004 43, 605-608.
64. Van Uden E, Carlson G, St George-Hyslop P, Westaway D, Orlando R, Mallory M, Rockenstein E, Masliah E. Aberrant presenilin-1 expression downregulates LDL receptor-related protein (LRP): is LRP central to Alzheimer's disease pathogenesis? *Mol Cell Neurosci*. 1999 Aug;14(2):129-40.
65. Van Uden E, Kang DE, Koo EH, Masliah E. LDL receptor-related protein (LRP) in Alzheimer's disease: towards a unified theory of pathogenesis. *Microsc Res Tech*. 2000 Aug 15;50(4):268-72.
66. Vargas T, Bullido MJ, Martinez-Garcia A, Antequera D, Clarimon J, Rosich-Estrago M, Martin-Requero A, Mateo I, Rodriguez-Rodriguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gomez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro E. A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 5;153B(4):895-902.
67. Vassar R, Citron M. Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron*. 2000 Sep;27(3):419-22.
68. von Arnim CA, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD, Liu CX, Bacskai BJ, Sever S, Irizarry MC, Strickland DK, Hyman BT. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem*. 2005 May 6;280(18):17777-85.
69. Walsh DM, Klyubin I, Shankar GM, Townsend M, Fadeeva JV, Betts V, Podlisky MB, Cleary JP, Ashe KH, Rowan MJ, Selkoe DJ. The role of cell-derived oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 5):1087-90.
70. Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalyn. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8460-4.
71. Wirths O, Multhaup G, Bayer TA. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J Neurochem*. 2004; 91(3):513-20.
72. Zheng W, Aschner M, Ghersi-Egea JF. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003 192:1-11.
73. Zheng W, Zhao Q. The blood-CSF barrier in culture. Development of a primary culture and transepithelial transport model from choroidal epithelial cells. *Methods Mol Biol* 2002; 188: 99-114.
74. Zlokovic BV, Shinya Y, Holtzman D, Ghiso J, Frangione B. Clearance of amyloid  $\beta$ -peptide from brain: transport or metabolism. *Nat Med* 2000;6:718-719.
75. Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2004; 89(4): 807-11.
76. Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005; 28(4):202-8.
77. Zlokovic BV. New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2008 Jul;5(3):409-14.