

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular



Relación entre las alteraciones del sueño, cambios de la estructura cortical y marcadores en sangre periférica en personas mayores con deterioro cognitivo leve

Tesis Doctoral
presentada por

Mayely Paola Sánchez Espinosa

Dirigida por

Dr. José Luis Cantero Lorente

Dra. Mercedes Atienza Ruiz

Sevilla, 2017



D. José Luis Cantero Lorente y Dña. Mercedes Atienza Ruiz, ambos Profesores Titulares del área de Fisiología, del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, perteneciente a la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que Dña. Mayely Paola Sánchez Espinosa ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis titulado *“Relación entre las alteraciones del sueño, cambios de la estructura cortical y marcadores en sangre periférica en personas mayores con deterioro cognitivo leve”*. Este trabajo reúne las condiciones académicas exigidas para optar al Grado de Doctor con mención Internacional por la Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Sevilla, a 24 de mayo de 2017

Fdo.: Dr. José Luis Cantero Lorente

Fdo.: Dra. Mercedes Atienza Ruiz

Fdo.: Mayely Paola Sánchez Espinosa

A mi padre Q.E.P.D., por su fe ciega en mis decisiones y por su afán para que me formara profesionalmente

A mi madre, por los principios morales y por tantos sacrificios en su vida para que yo llegara a este punto

Agradecimientos

A los directores de esta Tesis, por plantearme los retos más exigentes a los que me he enfrentado. Además, por el tiempo y dedicación en cada una de las ideas de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, muchos de ellos fueron la clave para que todos los experimentos de este trabajo salieran adelante. Nunca he visto tanta solidaridad junta, como la que me brindaron para hacer mi vida más alegre de lo que es.

A quienes sin conocerme me ayudaron a resolver infinidad de cuestiones, me quedo con libretas de explicaciones y conocimientos, pero también me quedo con su ejemplo de ayuda desinteresada que intentaré llevar allí donde vaya.

A mis nuevos amigos, el mejor regalo de vida que me deja este tiempo de doctorado. Su cariño y ejemplo han contribuido a mi formación personal. Gracias por la complicidad y por estar en todos los momentos.

A mi familia de cuna por enseñarme desde pequeña el significado de la valentía, esto es lo que me ha mantenido a flote y con ganas de dar pasos cada vez más grandes. A mi segunda familia, por alivianar las cargas, motivarme y brindarme su cariño en todos los momentos de este recorrido. Pero en especial a mi pareja, quien sin duda se ha convertido en el principal apoyo para superar todos los obstáculos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
RESUMEN / SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. La Enfermedad de Alzheimer	14
1.1.1. <i>Patología de la enfermedad de Alzheimer</i>	16
1.1.2. <i>Alteraciones neuroquímicas en la enfermedad de Alzheimer</i>	21
1.1.3. <i>Genética de la enfermedad de Alzheimer</i>	23
1.1.4. <i>Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer</i>	25
1.1.4.1. <i>Marcadores de Aβ</i>	26
1.1.4.2. <i>Marcadores de neurodegeneración</i>	27
1.2. Marcadores en sangre de la enfermedad de Alzheimer	29
1.2.1. <i>Marcadores de Aβ</i>	30
1.2.2. <i>Marcadores de estrés oxidativo</i>	32
1.2.3. <i>Homocisteína</i>	34
1.3. El sueño en la enfermedad de Alzheimer	36
2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS E HIPÓTESIS	41
2.1. Planteamiento general de los objetivos	41
2.2. Hipótesis sobre la relación del sueño con los niveles plasmáticos de A β y con el espesor cortical en pacientes con DCLa	43
2.3. Hipótesis sobre la relación entre el sueño, los niveles de homocisteína y el estado antioxidante en pacientes con DCLa	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Sujetos	49
3.2. Determinación de parámetros en sangre periférica	51
3.2.1. <i>Determinación de las concentraciones plasmáticas de Aβ</i>	51
3.2.2. <i>Determinación de la capacidad antioxidante (TAC)</i>	52
3.2.3. <i>Determinación de las concentraciones de homocisteína (HCY)</i>	55
3.3. Registros de polisomnografía y clasificación de las fases del sueño	55
3.4. Adquisición y post-procesamiento de las imágenes de RM cerebral	58
3.4.1. <i>Estimación del espesor cortical</i>	58
3.4.2. <i>Estimación del volumen de sustancia gris cerebral</i>	61
3.5. Análisis estadísticos	62

4. RESULTADOS	69
4.1. Perfil demográfico y cognitivo de la muestra	69
4.2. Diferencias de grupo en la estructura del sueño	70
4.3. Diferencias de grupo en los marcadores en sangre periférica	71
4.4. Diferencias de grupo en los marcadores de neuroimagen	72
4.5. Relación entre los parámetros de sueño y los marcadores en sangre periférica	74
4.6. Relación entre los cambios en la estructura del sueño y los marcadores de neuroimagen	77
4.7. Relación entre los marcadores en sangre periférica y los marcadores de neuroimagen	79
4.8. Papel mediador del sueño	83
5. DISCUSIÓN	89
5.1. Los pacientes con DCLa presentan niveles elevados de A β plasmático	91
5.2. El incremento de las concentraciones plasmáticas de A β está asociado a disminuciones del espesor cortical en pacientes con DCLa	93
5.3. El incremento de los niveles plasmáticos de A β está asociado a alteraciones del sueño en pacientes con DCLa	95
5.4. La disminución del sueño REM está relacionada con reducciones del espesor cortical en pacientes con DCLa	98
5.5. La calidad del sueño como mediador de la relación entre HCY y TAC en pacientes con DCLa	101
5.6. Limitaciones del estudio	109
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	147
Anexo I. Artículo publicado en <i>Neuroimage</i> (2014)	147
Anexo II. Artículo en revisión	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Posibles rutas en el procesamiento postraduccional de la APP	17
Figura 2.	Relación entre la acumulación extracelular de A β y la activación microglial durante el curso de la EA	18
Figura 3.	Tau en condiciones normales y patológicas	20
Figura 4.	Distribución regional de la neuropatología durante el curso de la EA	21
Figura 5.	Montaje del ensayo ORAC	53
Figura 6.	Montaje de PSG empleado en el presente estudio	56
Figura 7.	Diagrama esquemático de la metodología empleada para estimar los cambios de espesor cortical	60
Figura 8.	Diagrama esquemático del post-procesamiento de la imagen de RM para estimar los cambios de volumen de SG cerebral	61
Figura 9.	Modelo de mediación simple	64
Figura 10.	Diferencias de grupo en los marcadores en sangre periférica	72
Figura 11.	Diferencias de grupo en el espesor cortical	73
Figura 12.	Diferencias de grupo en el volumen de SG cerebral	74
Figura 13.	Relación entre la densidad de arousals en SOL y las concentraciones plasmáticas de A β ₁₋₄₂	75
Figura 14.	Relación entre parámetros de sueño, concentraciones de HCY y TAC	76
Figura 15.	Relación entre el porcentaje de sueño REM y los cambios de espesor cortical en pacientes con DCLa	78
Figura 16.	Relación entre las concentraciones plasmáticas de A β y los cambios de espesor cortical en pacientes con DCLa	81
Figura 17.	Relación entre las concentraciones de HCY y la TAC con el volumen de SG cerebral	83
Figura 18.	Efectos de mediación simple y múltiple	84
Figura 19.	Modelo basado en las relaciones entre los marcadores empleados en el presente estudio, el Cu y los problemas respiratorios durante el sueño	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características demográficas y cognitivas de la muestra	70
Tabla 2.	Parámetros de sueño	71
Tabla 3.	Correlaciones entre el porcentaje de sueño REM y el espesor cortical en pacientes con DCLa	77
Tabla 4.	Correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de A β y los cambios de espesor cortical en pacientes con DCLa	82

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una demencia neurodegenerativa causada por la presencia de depósitos proteicos de naturaleza patológica. Esta enfermedad cursa con atrofas cerebrales que se acompañan de un deterioro progresivo de la memoria desde su fase prodrómica, conocida como deterioro cognitivo leve (DCL). Aunque la investigación en las últimas décadas ha arrojado información muy valiosa sobre diferentes aspectos de esta condición neurodegenerativa, existe un profundo desconocimiento sobre los mecanismos que desencadenan la patología subyacente.

Evidencias recientes han mostrado una relación entre la aparición de las primeras placas de beta amiloide ($A\beta$) y las alteraciones de la estructura del sueño en modelos experimentales de la EA, alimentando la hipótesis de que la relación recíproca entre estos dos parámetros podría facilitar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, son escasos los estudios que han tratado de validar esta hipótesis en humanos, a pesar de que las alteraciones del sueño están presentes desde la fase prodrómica de la EA. El primer objetivo del presente estudio fue por tanto determinar si las alteraciones del sueño que muestran los pacientes con DCL se acompañan de cambios en las concentraciones plasmáticas de $A\beta$ y de cambios cerebrales estructurales asociados a la neurodegeneración.

Por otra parte, estudios previos han puesto de manifiesto que los DCL presentan un incremento de los niveles circulantes de homocisteína (HCY) y una disminución de la capacidad antioxidante total (TAC). Dado que el incremento de HCY y la reducción del tiempo total de sueño agravan el daño oxidativo cerebral, nos planteamos como segundo objetivo determinar si la duración del sueño en los pacientes con DCL podría actuar como mediador de la relación existente entre HCY y TAC.

Para tratar de dar respuesta a estas cuestiones, se han realizado estudios de polisomnografía nocturna, resonancia magnética cerebral y determinaciones de $A\beta$, HCY y TAC a 21 personas mayores normales (controles) y 21 pacientes con DCL de tipo amnésico (DCLa). Los análisis

revelaron que cuanto más altas eran las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-42}$ más pronunciada fue la fragmentación del sueño de ondas lentas en estos pacientes. Además, la disminución del sueño REM observada en los DCLa se acompañó de reducciones del espesor cortical en regiones del cíngulo posterior, precúneo y giro post-central, mientras que el incremento de las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ correlacionó con disminuciones del espesor cortical en el cíngulo posterior y corteza entorrinal, respectivamente. Estudios previos han mostrado que la mayoría de estas regiones corticales están afectadas desde las fases más tempranas de la EA.

Los pacientes con DCLa también mostraron una relación inversa entre los niveles de HCY y TAC. Ambos parámetros correlacionaron con una disminución de la calidad del sueño (*i.e.*, duración y eficiencia de sueño) y con reducciones de volumen del lóbulo temporal. Los análisis de mediación no solo confirmaron que la relación inversa entre HCY y TAC estaba mediada por la calidad del sueño en los pacientes con DCLa, sino que además mostraron que el impacto de la HCY sobre la integridad estructural del lóbulo temporal estaba mediado por la relación existente entre la calidad de sueño y la TAC.

En conjunto, estos resultados apuntan a que las alteraciones del sueño que muestran los pacientes con DCLa están relacionadas con la patofisiología de la EA, posiblemente contribuyendo a la progresión de la amiloidosis cerebral. Además, abren nuevas vías de investigación dirigidas a modificar la trayectoria del envejecimiento a partir de estrategias basadas en la mejora de la calidad de sueño y en la reducción del daño oxidativo.

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative dementia caused by the presence of protein deposits of a pathological nature. This disease is characterized by cerebral atrophies together with a progressive deterioration of memory from its prodromal stage, known as mild cognitive impairment (MCI). Although research over the last 20 years has yielded valuable information on different aspects of this neurodegenerative condition, there is a profound lack of knowledge about the mechanisms that trigger the underlying pathology.

Recent evidence has shown a relationship between the appearance of amyloid beta ($A\beta$) plaques and sleep structure alterations in experimental models of AD, fueling the hypothesis that the reciprocal relationship between these two parameters could facilitate progression of the disease. However, few studies have tried to validate this hypothesis in humans, despite the fact that sleep disturbances are present beginning in prodromal phase of AD. The first objective of the present study was therefore to determine if the sleep disturbances shown by patients with MCI are accompanied by changes in plasma concentrations of $A\beta$ and structural brain changes associated with neurodegeneration.

Previous studies have shown that MCI patients display an increase in circulating levels of homocysteine (HCY) and a decrease of the total antioxidant capacity (TAC). Since the increase of HCY and the reduction of total sleep time exacerbate brain oxidative damage, our second objective was to determine if sleep duration in MCI could act as mediator of the relationship between HCY and TAC.

In order to answer these questions, studies of nocturnal polysomnography, brain magnetic resonance and $A\beta$, HCY, and TAC determinations in peripheral blood have been performed on 21 normal elderly subjects (controls) and 21 patients with amnesic MCI (aMCI). Analyses revealed that the higher the plasma concentrations of $A\beta_{1-42}$, the more pronounced the fragmentation of slow-wave sleep in these patients. In addition, the decrease in REM sleep in aMCI patients was accompanied by reductions in cortical thickness in the posterior cingulate, precuneus and postcentral gyrus, whereas increased plasma levels of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$

correlated with thinning of the posterior cingulate and entorhinal cortex, respectively. Previous studies have shown that most of these cortical regions are affected from the earliest stages of AD.

Patients with aMCI also showed an inverse relationship between HCY levels and TAC. Both parameters were correlated with a decrease in sleep quality (*i.e.*, duration and sleep efficiency) and with temporal lobe volume reductions. Mediation analyses not only confirmed that the inverse relationship between HCY and TAC was mediated by sleep quality in patients with aMCI, but also showed that the impact of HCY on the structural integrity of the temporal lobe was mediated by the relationship between the quality of sleep and the TAC.

Taken together, these results suggest that the sleep disturbances shown by patients with aMCI are likely related to the pathophysiology of AD, possibly contributing to the progression of cerebral amyloidosis. In addition, they open new avenues of research aimed at modifying the path of aging through strategies based on the improvement of sleep quality and reduction of oxidative damage.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El incremento de la esperanza de vida en los últimos 30 años ha supuesto que una condición neurodegenerativa asociada al envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer (EA), ocupe el quinto lugar entre las principales causas de mortalidad (GBD, 2013). La EA está considerada por la Organización Mundial de la Salud como un problema de salud pública prioritario, cuya prevalencia incrementará en los próximos años hasta alcanzar los 100 millones de personas en 2050 (World Health Organization, 2012).

Aunque desafortunadamente no existen terapias eficaces que detengan, enlentezcan o reviertan los síntomas de dicha enfermedad (Gauthier *et al.*, 2016), parece que el éxito de las intervenciones podría aumentar si se aplicaran en las fases más tempranas de la EA (Gauthier, 2005; Cummings *et al.*, 2007). De ahí que una parte importante de los esfuerzos realizados en las últimas dos décadas se hayan dedicado a identificar aquellos eventos que preceden a los primeros síntomas de la enfermedad. Las alteraciones del ciclo vigilia-sueño podrían ser uno de estos eventos (Gerstner *et al.*, 2012). De hecho, evidencias recientes obtenidas con modelos animales sugieren que la acumulación extracelular de agregados de la proteína beta amiloide (A β), una de las dos proteinopatías cerebrales que caracterizan a la EA (Selkoe & Hardy, 2016), se acompaña de alteraciones de la estructura del sueño, lo cual a su vez promueve la agregación del A β y, por ende, la progresión de la enfermedad (Roh *et al.*, 2012). Sin embargo, a día de hoy carecemos de información que nos permita determinar si las alteraciones del sueño son un elemento clave en la patofisiología de la EA o un marcador de la progresión de la enfermedad (Lucey & Bateman, 2014). El presente trabajo de Tesis pretende arrojar luz sobre algunos de estos aspectos. Dado que en estudios previos hemos mostrado que los pacientes con deterioro cognitivo leve de tipo amnésico (DCLa), considerado como la fase prodrómica de la EA (Dubois & Albert, 2004), presentan alteraciones de la estructura del sueño (Hita-Yáñez *et al.*, 2012, 2013), en el presente trabajo evaluaremos si dichas alteraciones están relacionadas a su vez con cambios estructurales en el cerebro y con

marcadores de la EA en sangre periférica, como las concentraciones de A β , homocisteína (HCY) y estado antioxidante.

La Introducción comenzará con una descripción de las principales características de la EA, incluyendo su patología y los aspectos genéticos más relevantes. Se continuará con una breve revisión de los biomarcadores más empleados en el diagnóstico de la EA, haciendo especial hincapié en aquellos derivados del líquido cerebroespinal (LCE) y de la neuroimagen. Ato seguido, se revisará el potencial de algunos de los biomarcadores en sangre periférica más utilizados en la EA. Finalmente, y dado que el sueño se ve alterado durante el curso de la enfermedad, realizaremos una breve revisión sobre las alteraciones del sueño típicamente asociadas a esta condición neurodegenerativa, destacando las posibles relaciones que pudieran existir entre dichas alteraciones y la patología que subyace a la EA.

1.1. La enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno neurológico progresivo y degenerativo que cursa inicialmente con un deterioro de la memoria acompañado de alteraciones de la estructura y función cerebral. Se estima que 30 millones de personas en el mundo padecen EA (World Alzheimer Report, 2015), siendo la séptima causa de muerte en España (Instituto Nacional de Estadísticas, 2015; <http://www.ine.es>). De hecho, la EA se ha convertido en la enfermedad que mayor crecimiento ha experimentado entre 1990-2013 (GBD, 2013), mostrando una incidencia de entre el 1-3% en la población general y una prevalencia de entre el 10-30% en personas mayores de 65 años (Bachman *et al.*, 1993; Kawas *et al.*, 2000). El coste anual de la EA alcanza los 818 millones de dólares, importe que representa un 1,09% del producto interior bruto mundial. En Europa, un 19,3% de este gasto se dedica a atención médica directa, un 43% a gastos de asistencia social (*e.g.*, atención domiciliaria profesional y de enfermería) mientras que un 37,6% del gasto es asumido por familiares que se dedican al cuidado diario del paciente (World Alzheimer Report, 2015). Este presupuesto contrasta con la escasa financiación dedicada a la investigación de esta patología neurodegenerativa en comparación con otras enfermedades igualmente

relevantes. Por poner un ejemplo, Estados Unidos dedica anualmente 10 veces más a la investigación sobre el cáncer que a la relacionada con la EA, a pesar de que los costes derivados de la EA son sensiblemente mayores y el número de muertes derivadas de ambas enfermedades es similar (Alzheimer's Association, 2016).

La EA es la forma más común de demencia neurodegenerativa. En los años previos al diagnóstico, los pacientes manifiestan un deterioro leve de la memoria que no interfiere excesivamente con las actividades de la vida diaria. Durante la EA leve, las alteraciones de la memoria se acompañan de déficits del lenguaje, dificultades visuo-espaciales y cambios de personalidad (e.g., aislamiento, escasa iniciativa y ocasionalmente síntomas de depresión). En la fase moderada, los déficits de memoria no solo se vuelven más evidentes, sino que además el paciente muestra una cierta incapacidad para relacionarse con los demás y para realizar de manera independiente determinadas actividades cotidianas. En la etapa severa de la EA, los pacientes son totalmente dependientes de sus cuidadores y a menudo no hablan, no se mueven y presentan dificultades para tragar y/o controlar los esfínteres (Förstl & Kurz, 1999).

El DCL se considera la fase prodrómica de la EA (Dubois & Albert, 2004). Los pacientes con DCL presentan un deterioro progresivo de la memoria más acentuado que el que muestran las personas de su edad, al mismo tiempo que mantienen intacta su capacidad para desarrollar actividades de la vida diaria. La caracterización de los cambios cognitivos, bioquímicos y cerebrales asociados a la fase prodrómica de la EA ha sido posible gracias a la avalancha de contribuciones científicas que se ha producido sobre este tópico en las dos últimas décadas, lo cual ha mejorado sensiblemente nuestro conocimiento sobre los límites biológicos entre el envejecimiento normal y las fases más tempranas de la EA (Blasko *et al.*, 2006). Además, la fase prodrómica de la EA ha recibido una atención especial porque determinadas intervenciones farmacológicas podrían tener una mayor eficacia en pacientes con DCL que en aquellos con EA (Gauthier, 2005; Cummings *et al.*, 2007).

1.1.1. Patología de la enfermedad de Alzheimer

Los pacientes con EA muestran dos tipos de depósitos proteicos de naturaleza patológica: las placas de A β que se acumulan en el espacio extracelular y los ovillos neurofibrilares (ONF) intracelulares causados por la hiperfosforilación de la proteína tau (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Ambas lesiones tienen efectos neurotóxicos, alteran el funcionamiento y la respuesta celular, producen daños sinápticos, inducen neuroinflamación y, en último extremo, causan muerte neuronal. Numerosas evidencias apuntan a que cada uno de estos procesos, de forma aislada o combinada, se asocian a estadios diferentes de la EA (Jack *et al.*, 2010; Albert *et al.*, 2011; McKhann *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011).

El A β se sintetiza en las neuronas a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (*amyloid precursor protein*; APP, siglas en inglés). La APP es una glicoproteína integral de membrana de tipo I que posee un largo dominio extracelular N-terminal globular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto (Rajendran & Annaert, 2012). Aunque se desconoce la función fisiológica de la APP, diferentes estudios la han implicado en procesos de adhesión y señalización celular (Wolfe & Guénette, 2007) además de otorgarle propiedades neuroprotectoras, antioxidantes y neurotróficas (Thinakaran & Koo, 2008; O'Brien & Wong, 2011).

Existen dos vías alternativas de procesamiento postraducciona l de la APP. La *ruta no amiloidogénica*, predominante en la mayoría de las células, en la que la proteólisis se desarrolla dentro de la región que da lugar al A β , evitando así su producción. En esta vía, que ocurre fundamentalmente en la membrana plasmática, la fragmentación de la APP la realiza la enzima α -secretasa, generando un fragmento soluble (sAPP α) al que se le atribuyen propiedades neuroprotectoras y neurotróficas (Hiltunen *et al.*, 2009). Por otra parte, está la *ruta amiloidogénica*, muy poco frecuente en la mayoría de células, excepto en las neuronas. En esta vía actúan secuencialmente las enzimas β - y γ -secretasas que dan lugar a los péptidos de A β (de 38-43 aminoácidos) (Rajendran & Annaert, 2012). Este procesamiento se realiza, principalmente, en determinados orgánulos celulares, ya que la APP es reinternalizada desde

la membrana plasmática en un compartimento endosomal que contiene las proteasas BACE-1 y γ -secretasa (Thinakaran & Koo, 2008; Zhang *et al.*, 2011). La estructura de los péptidos de $A\beta$ se modifica una vez alcanzan el espacio extracelular, pasando de una estructura con forma de hélice α a una de hojas β extendidas. Por causas que aún se desconocen, estos péptidos se convierten en monómeros de $A\beta$ mal plegados que dan lugar a oligómeros de bajo (e.g., dímeros y trímeros) o alto peso molecular (e.g., protofibrillas y fibrillas) (Larson & Lesné, 2012). En la **Figura 1** se ilustran de forma esquemática estas dos rutas.

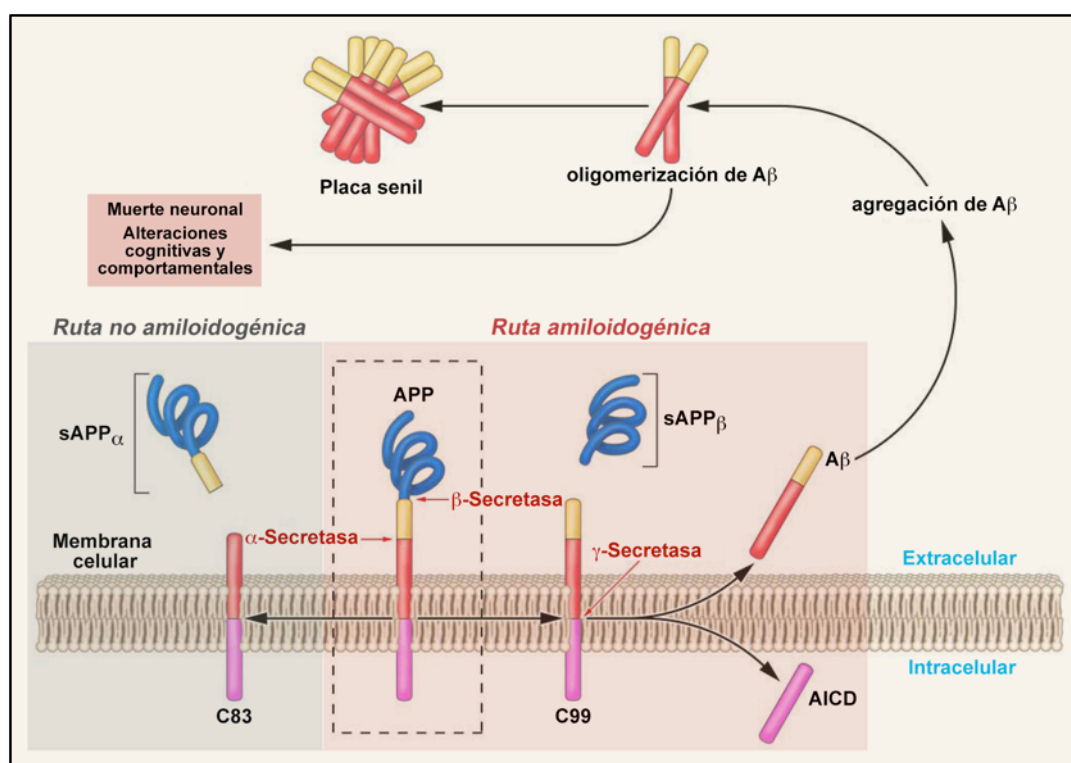


Figura 1. Posibles rutas en el procesamiento postraduccional de la APP. En la vía no amiloidogénica, la acción de la enzima α -secretasa da lugar a la $sAPP_{\alpha}$ y a otros productos proteolíticos como el C83. Los diferentes péptidos de $A\beta$ se generan a partir de la vía amiloidogénica. Para ello, en primer lugar, la enzima β -secretasa genera un fragmento soluble extracelular ($sAPP_{\beta}$). Posteriormente, la enzima γ -secretasa realiza un corte en el extremo que permanece unido a la membrana, generando péptidos de $A\beta$ de diferentes tamaños. Estos péptidos son liberados al espacio extracelular en forma de monómeros para luego ser eliminados o ensamblarse formando oligómeros y agregados de $A\beta$ que causan daño sináptico y deterioro cognitivo. Figura modificada de Spies *et al.* (2012).

La acumulación del A β fibrilar activa una serie de mecanismos que conducen a la neuroinflamación y, en último extremo, a la muerte neuronal. La **Figura 2** ilustra de manera resumida este proceso.

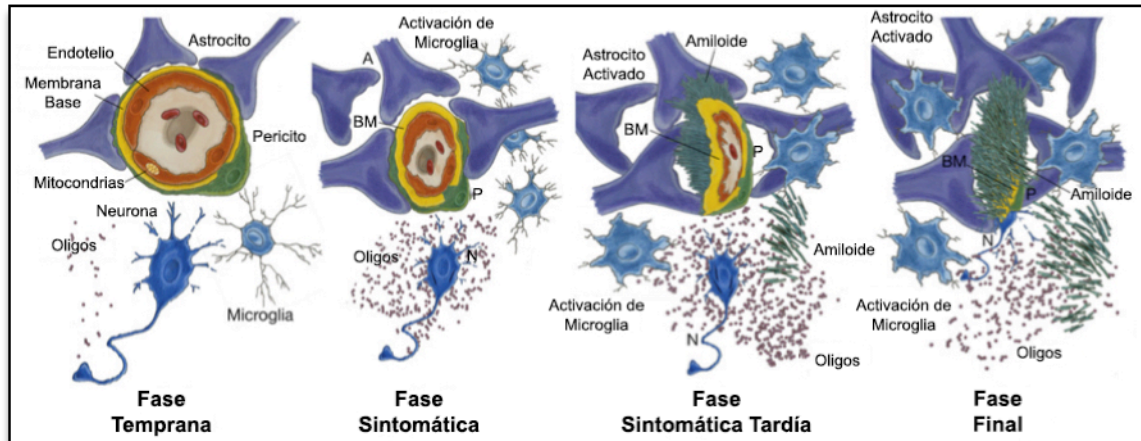


Figura 2. Relación entre la acumulación extracelular de A β y la activación microglial durante el curso de la EA. Durante la fase más temprana de la EA, ciertas alteraciones homeostáticas conducen a la acumulación de oligómeros de A β . En la fase sintomática se producen disfunciones de la barrera hematoencefálica que dificultan el aclaramiento del A β , incrementándose así las concentraciones de A β extracelular y con ello la respuesta microglial. En la fase tardía, la degeneración de las células endoteliales impide la eliminación del A β , se reduce el flujo sanguíneo y se deteriora la unidad capilar. Finalmente, se produce una respuesta neuroinflamatoria y un colapso de la unidad capilar, que además de provocar daño sináptico puede producir muerte neuronal. Figura modificada de Zlokovic (2008).

Durante los estadios más tempranos de la EA, la acumulación de oligómeros solubles de A β estaría facilitada por las disfunciones que ocurren en la barrera hematoencefálica (BHE). Tanto los oligómeros de A β como la reducción del flujo sanguíneo capilar podrían afectar a la transmisión sináptica, causando lesiones neuronales y el consiguiente reclutamiento de la microglía. Durante la fase sintomática leve, la BHE comienza a perder sus propiedades para eliminar el A β , de manera que el endotelio secreta citoquinas proinflamatorias y supresoras del flujo sanguíneo cerebral, que resulta en disfunciones sinápticas, acumulación de ONF y activación de la microglía. Durante la fase sintomática tardía, la unidad capilar se deforma al degenerarse la barrera endotelial. Paralelamente, ocurre una pérdida severa de la capacidad para eliminar A β , produciéndose una adherencia de las placas de A β a la membrana capilar, un

incremento de ONF y una activación de microglía y astrocitos. En la fase final de la EA, desaparece la unidad capilar, se reduce sensiblemente la densidad sináptica e incrementa drásticamente la muerte neuronal (Itagaki *et al.*, 1989; Akiyama *et al.*, 2000; Zlokovic, 2008).

En condiciones fisiológicas normales, la producción de A β está compensada por su eliminación a través de varios procesos. La vía más directa es mediante el transporte de A β desde el fluido intersticial cerebral al LCE y luego a las membranas perivasculares de la BHE, bien sea a través de los receptores de lipoproteínas de baja densidad 1 (*low density related-protein 1*; LRP1, siglas en inglés) o mediante mecanismos que involucran a la apolipoproteína E (ApoE) (Sagare *et al.*, 2007; Deane *et al.*, 2009). El A β también puede eliminarse por la actuación de un amplio número de endoproteasas que se encuentran en los astrocitos (Saido & Leissring, 2012). Cuando los mecanismos de eliminación de A β fallan, A β se agrega en placas, elevando los niveles de neurotoxicidad, incrementando el daño sináptico, y retroalimentando la agregación de tau (Blurton-Jones & LaFerla, 2006).

Los agregados fibrilares de proteína tau son el otro evento neuropatológico de la EA. Tau es una proteína neuronal hidrofílica que pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos. Las modificaciones postraduccionales a las que tau es sometida (*e.g.*, fosforilación y glicosilación) generan una gran variedad de isoformas en el sistema nervioso central (Lee *et al.*, 1988; Goedert & Jakes, 1990). En condiciones normales, tau facilita el ensamblaje de la tubulina, estabilizando la organización de los microtúbulos y manteniendo las prolongaciones citoplasmáticas de las células nerviosas (Weingarten *et al.*, 1975). Cuando la fosforilación de tau se vuelve excesiva, disminuye su capacidad de unión a la tubulina y los dominios de unión a los microtúbulos se liberan para formar pequeños depósitos (pre-ovillos) que adoptan una estructura de hojas β con filamentos helicoidales apareados (Goux, 2002). Al ensamblarse, estos filamentos dan lugar a los ONF, que provocan cambios en el citoesqueleto neuronal así como en la localización y organización de las mitocondrias y los lisosomas, lo que conduce a la interrupción de la sinapsis y en última instancia a la muerte neuronal (Iqbal *et al.*, 2009). La **Figura 3** ilustra las modificaciones de la proteína tau en condiciones normales y patológicas.

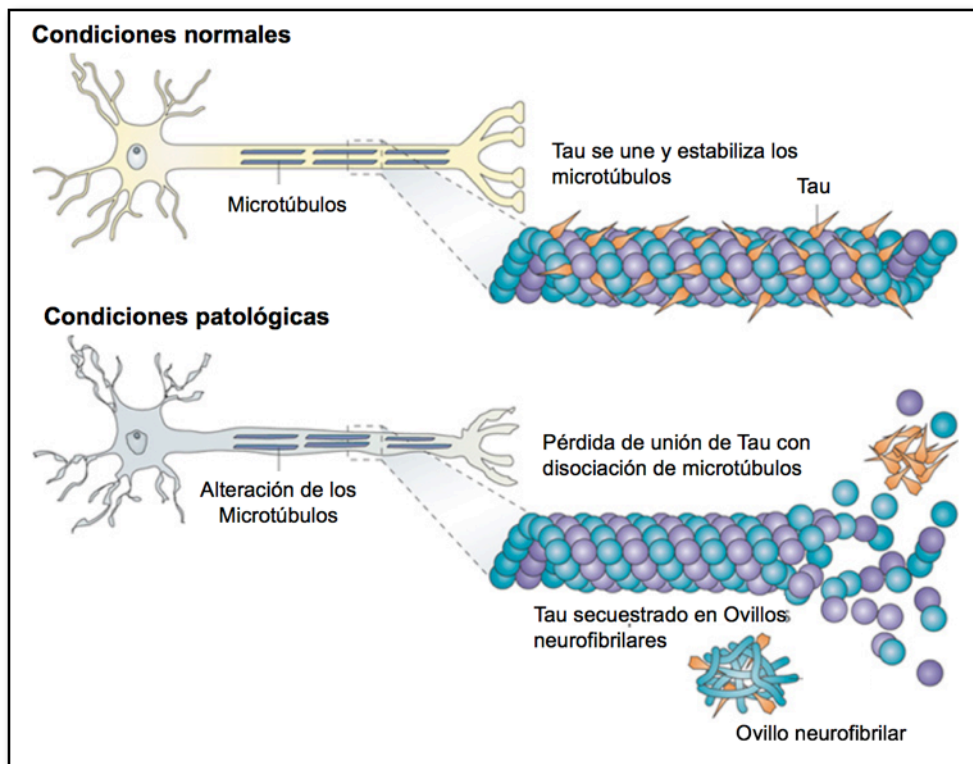


Figura 3. Tau en condiciones normales y patológicas. En condiciones normales (panel superior), la proteína tau facilita la estabilización de los microtúbulos que conforman el citoesqueleto de la neurona. En condiciones patológicas (panel inferior), el exceso de fosforilación produce una desestabilización de los microtúbulos que da lugar a los ONF. Figura modificada de Brunden *et al.* (2009).

El curso temporal y la distribución regional cerebral de la patología que subyace a la EA se ha descrito exhaustivamente en diferentes estudios (Braak & Braak, 1991; Thal *et al.*, 2000), llegándose a incorporar los hallazgos de dichos estudios a los criterios neuropatológicos de la EA propuestos por el *National Institute of Aging-Alzheimer Association* (Hyman *et al.*, 2012). Estos trabajos han mostrado que los primeros ONF aparecen en el locus coeruleus y en diferentes regiones del lóbulo temporal medial (*e.g.*, corteza transentorrinal e hipocampo) para después extenderse hacia otras regiones del lóbulo temporal y la corteza cingulada posterior, hasta finalmente alcanzar regiones isocorticales. Estos hallazgos han sido replicados por diferentes autores (Braak *et al.*, 2006; Braak & Del Tredici, 2011; Serrano-Pozo *et al.*, 2011). En el caso de las placas seniles, la progresión de la enfermedad es más difusa pero, de manera general, los agregados de A β aparecen inicialmente en diferentes regiones de la neocorteza,

extendiéndose posteriormente por la allocorteza (corteza entorrinal e hipocampo), los ganglios basales, diferentes núcleos troncoencefálicos y el cerebelo. La **Figura 4** ilustra el curso temporal de las placas de A β y de los ONF en diferentes estadios de la EA, mostrando las principales diferencias topográficas en regiones del lóbulo temporal y de la corteza sensorio-motora. De manera general, las áreas visuales tienden a estar menos afectadas que las áreas de asociación durante el curso de la enfermedad (Arnold *et al.*, 1991; Braak & Braak, 1991).

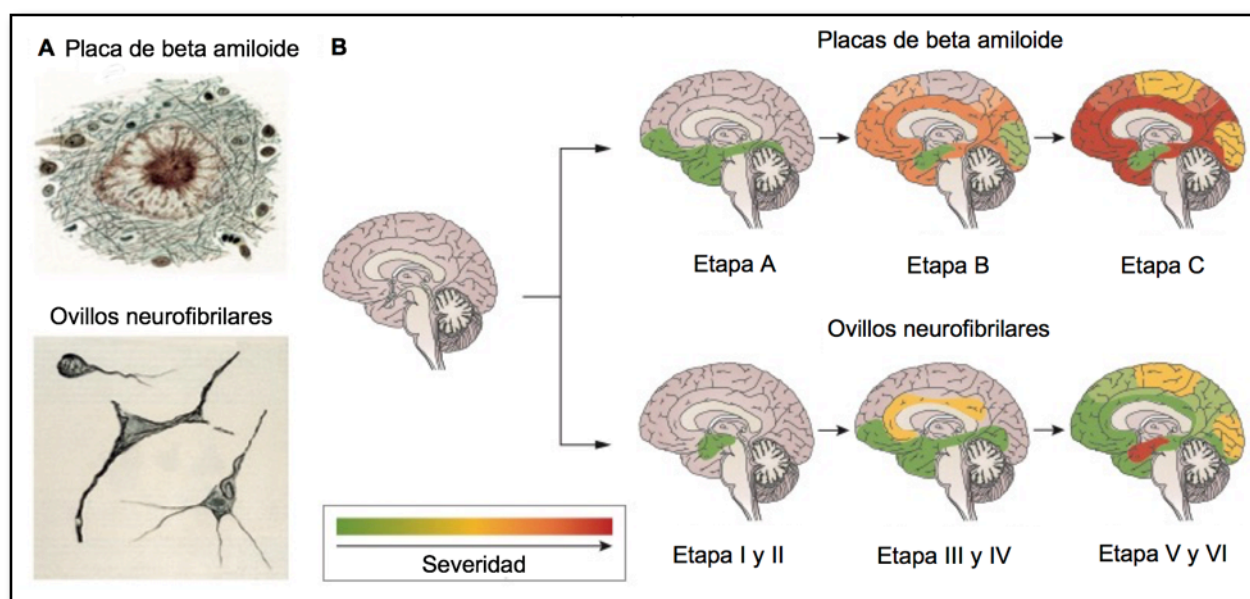


Figura 4. Distribución regional de la neuropatología durante el curso de la EA. A. La EA se asocia con la acumulación cerebral de placas de A β y ONF. B. Distribución regional de ambas proteinopatías durante el curso de la enfermedad. Figura modificada de Masters *et al.* (2015).

1.1.2. Alteraciones neuroquímicas en la enfermedad de Alzheimer

Estudios realizados en la década de los 70 revelaron que los pacientes con EA mostraban alteraciones en la colina acetiltransferasa (ChAT), enzima responsable de la síntesis de acetilcolina (ACh) (Bowen *et al.*, 1976; Davies & Maloney 1976). Este déficit resulta en una disminución de neuronas colinérgicas que afecta, de manera bilateral y simétrica, a regiones del lóbulo temporal (Geula & Mesulam, 1996). Este fenómeno está principalmente causado por la muerte de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert (Whitehouse *et al.*, 1982),

evidenciándose por lo tanto déficits en la recaptación (Rylett *et al.*, 1993) y liberación de ACh (Nilsson *et al.*, 1986) que vienen a confirmar el daño colinérgico a nivel presináptico. Estos estudios, junto con otros que demuestran el papel central que juega la ACh en el aprendizaje y la memoria (Hasselmo & Bower, 1993), contribuyeron a formalizar lo que hoy conocemos como la hipótesis colinérgica de la EA (Bartus *et al.*, 1982).

Aunque probablemente la disfunción colinérgica no es la principal causa del deterioro cognitivo (Hasselmo & Sarter, 2011), la hipótesis original postulaba que los fármacos pro-colinérgicos mejorarían la función cognitiva y las alteraciones del comportamiento. De ahí que el tratamiento farmacológico de la EA en las últimas décadas se haya basado en contrarrestar el déficit colinérgico que caracteriza a la enfermedad. Inicialmente, las estrategias terapéuticas se centraron inicialmente en la sustitución de precursores de ACh (colina o lecitina), sin embargo, estos agentes no lograban aumentar la actividad colinérgica central (Thal *et al.*, 1981). Una aproximación alternativa consistió en emplear inhibidores de la acetilcolinesterasa, a pesar de los importantes efectos secundarios que mostraban estos fármacos. Para abordar este problema, se emplearon agonistas de los receptores muscarínicos/nicotínicos M1, antagonistas muscarínicos M2, o inhibidores de la acetilcolinesterasa de segunda generación, a pesar de sus interacciones negativas con el metabolismo de la APP (Borroni *et al.*, 2002). De manera general, estos fármacos retardan la degradación metabólica de la acetilcolina promoviendo las sinapsis colinérgicas, lo que se traduce en una mejora de la función cognitiva. Algunos de estos medicamentos inhibidores de la colinesterasa han mostrado cierta efectividad controlando parte de la sintomatología durante algún tiempo, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad.

La liberación fásica de glutamato juega un papel importante en procesos relacionados con la plasticidad sináptica (Collingridge & Singer, 1990; Sheng & Kim, 2002), como el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, la liberación anormalmente prolongada de este neurotransmisor sobreestimula los receptores metabotrópicos NMDA, AMPA y kainato de las neuronas cercanas, produciendo una apertura prolongada de sus canales iónicos y una entrada excesiva de calcio a las neuronas. Como consecuencia, las células se hinchan y estallan, liberando el

glutamato al espacio extracelular y perpetuando este círculo vicioso (Choi & Rothman, 1990). Estudios previos han mostrado que la concentración de glutamato está significativamente reducida en pacientes con EA, pudiendo reducirse hasta en un 80% en el giro dentado (Hyman *et al.*, 1987) y en un 60% en áreas de la corteza frontal superior, temporal inferior y giro angular (Sasaki *et al.*, 1986). Uno de los mecanismos propuestos para justificar esta alteración es que la activación de los receptores NMDA estimule el procesamiento de APP, desencadenando una producción más elevada de A β que terminaría exacerbando el daño oxidativo y la neurotoxicidad (Lee *et al.*, 1995; Nitsch *et al.*, 1997). Dado que los receptores de glutamato más relacionados con este mecanismo son los NMDA, existen dos aproximaciones terapéuticas dirigidas a este tipo de receptores. La primera reduce la hiperexcitabilidad neuronal mediante un bloqueo de los receptores NMDA. La segunda aproximación asume que los receptores NMDA están hipoactivos durante las fases finales de la enfermedad, por lo que necesitan ser estimulados para contrarrestar el profundo deterioro cognitivo que caracteriza a estos estadios (Olney *et al.*, 1997). En la actualidad, existen antagonistas glutamatérgicos que tratan de aliviar parcialmente los síntomas de la EA en fases moderadas y severas (Reisberg *et al.*, 2003).

1.1.3. Genética de la enfermedad de Alzheimer

En función de las causas que originan la enfermedad, la incidencia y la edad de aparición de los primeros síntomas, se pueden diferenciar dos variantes de la EA (Bagyinszky *et al.*, 2014). La primera hace referencia a la EA familiar o monogénica, caracterizada por una herencia autosómica dominante con una penetrancia completa, mientras que la segunda se refiere a la EA esporádica o de inicio tardío en la que no se ha evidenciado ningún patrón de transmisión genética.

En la EA familiar, la sintomatología clínica aparece generalmente antes de los 60 años, mientras que en la EA esporádica comienzan a partir de los 65 años. En este último caso, la genética de la enfermedad no es determinante, pero existen ciertos factores de riesgo genético

que confieren una mayor susceptibilidad para desarrollar la patología (Bekris *et al.*, 2010). En la variante familiar los afectados presentan mutaciones en genes directamente involucrados en la codificación de la proteína precursora del amiloide (APP, proteína; *APP*, gen), la presenilina 1 (PSEN 1, proteína; *PSEN 1*, gen) o la presenilina 2 (PSEN 2, proteína; *PSEN 2*, gen) (Sherrington *et al.*, 1995; Cruts & Van Broeckhoven, 1998). La alteración de cualquiera de estas proteínas conduce a la acumulación patológica de A β . En la actualidad se han descrito 52 mutaciones en APP, 241 en PS1 y 45 en PS2 que generan EA familiar (<http://www.alzforum.org/mutations/>).

Portar el alelo 4 ($\epsilon 4$) en el gen *APOE* se considera el mayor factor de riesgo genético en la EA esporádica (Corder *et al.*, 1993). El gen *APOE* se expresa de tres formas diferentes, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, originando seis fenotipos que resultan de la combinación de dos polimorfismos de un solo nucleótido. El genotipo *APOE4* aparece con una frecuencia del 13,7% en la población general caucásica (Farrer *et al.*, 1997), siendo el riesgo para desarrollar la EA del 91% si se portan dos copias del alelo $\epsilon 4$, del 46% si se tiene al menos una copia, o del 20% si se portan ambos alelos $\epsilon 3$, el más frecuente en la población (Corder *et al.*, 1993). Los mecanismos mediante los cuales el genotipo *APOE4* incrementa el riesgo de desarrollar la patología son múltiples e incluyen *efectos dependientes del A β* , como por ejemplo, la modulación de los niveles de A β , la agregación, la neurotoxicidad y la neuroinflamación, así como *efectos independientes del A β* , tales como el desarrollo neuronal, metabolismo de la glucosa y excitabilidad neuronal (Liu *et al.*, 2013a). Estudios previos han mostrado que la mera interacción entre la ApoE y el A β (complejo ApoE/A β) causa un incremento de los niveles extracelulares de A β . Esta hipótesis postula que las lipoproteínas que transportan ApoE4 tienen menos posibilidad de ser lipidadas (*i.e.*, muestran una menor adición de moléculas hidrofóbicas a la proteína), reduciéndose así la estabilidad y los niveles del complejo ApoE/A β , lo cual se traduce en una mayor acumulación y agregación del A β cerebral (Tai *et al.*, 2014).

Estudios de asociación en todo el genoma (*Genome-wide association study*; GWAS, siglas en inglés) han identificado alrededor de 20 nuevos lugares de susceptibilidad para la EA (*e.g.*, ABCA7, BIN1, CLU, CR1, CD2AP, EPHA1, MS4A6A–MS4A4E, TREM2 y PICALM) (Bertram *et*

al., 2007; Lambert *et al.*, 2013). Cada uno de ellos contribuye modestamente al riesgo de desarrollar EA a través de alguna de estas tres vías: la relacionada con el sistema inmunológico y las respuestas inflamatorias (*e.g.*, CR1, HLA, MS4A6A, EPHA1), la relacionada con el metabolismo del colesterol y los lípidos (*e.g.*, SORL1, CLU, ABCA7) y/o la vía endosomal (*e.g.*, PICALM, BIN1, SORL1, CD2AP). Se piensa que la activación de estas vías, de manera conjunta o aislada, podría modificar los mecanismos que subyacen al aclaramiento y/o a la agregación del A β . Establecer un modelo poligénico de la EA esporádica requiere de estudios con grandes cohortes que permitan detectar los pequeños efectos genéticos de estos nuevos genes (Morgan, 2011).

1.1.4. Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer

Un biomarcador se define como una característica individual que se puede medir de manera objetiva y que refleja un proceso biológico normal, patológico o de respuesta a una intervención terapéutica específica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Gracias a los avances biotecnológicos realizados en las dos últimas décadas, se ha progresado en la identificación *in vivo* de los cambios fisiopatológicos que caracterizan a cada estadio de la EA, aspecto que ha permitido mejorar los criterios diagnósticos de la enfermedad al incorporar el uso de biomarcadores relacionados con la detección de sus lesiones (Jack *et al.*, 2010; Albert *et al.*, 2011; McKhann *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011).

La presencia de valores clínicos de amiloidosis y/o de daño neuronal refleja de manera indirecta la existencia de patología relacionada con la EA, aspecto que podría ayudar a mejorar el pronóstico de la enfermedad y/o a determinar la capacidad de respuesta ante un tratamiento específico (Sperling *et al.*, 2011). Sin embargo, resulta complicado establecer valores de corte para este tipo de fenómenos, dada su enorme variabilidad y su modulación por factores externos (McKhann *et al.*, 2011). Por otra parte, aproximadamente un 23% de las personas mayores asintomáticas y un 25% de los pacientes con DCL muestran niveles normales de A β junto con niveles anormales en determinados marcadores de neurodegeneración (Jack *et al.*,

2016). Este aspecto ha generado una cierta controversia, dado que no todos los marcadores de neurodegeneración son igualmente sensibles durante el curso de la enfermedad. Además, parte de las incongruencias derivadas del uso de determinados biomarcadores para el diagnóstico de diferentes fases de la EA podrían deberse a los procesos de selección de la muestra. Mientras que algunos estudios basan sus resultados en cohortes integradas por pacientes seleccionados de manera muy rigurosa, como en el caso de la *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative* (ADNI), otras cohortes están basadas en la comunidad, en las que los criterios diagnósticos son algo más laxos (Toledo *et al.*, 2014).

1.1.4.1. Marcadores de A β

La disminución de los niveles de A β ₁₋₄₂ en LCE se considera un marcador de la EA desde sus fases preclínicas (Blennow *et al.*, 2010). Se estima que las concentraciones del péptido A β ₁₋₄₂ en LCE están reducidas hasta en un 50% en pacientes con EA al compararlos con controles (Blennow & Hampel, 2003; Blennow, 2004). Esta disminución, aunque no es específica de la EA (Gloeckner *et al.*, 2008), correlaciona con la acumulación cerebral de placas de A β y presenta una elevada correspondencia con el diagnóstico de EA (Motter *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2003). A pesar del uso frecuente de los marcadores de LCE en ámbitos de investigación, aún quedan importantes lagunas que cubrir para que puedan ser extrapolados a la práctica clínica. Entre las principales limitaciones destacan su reducida especificidad a la hora de discriminar entre pacientes con DCL y EA, la gran variabilidad entre estudios debido al uso de diferentes reactivos y/o material de almacenamiento, así como la limitada automatización de sus procesos de cuantificación (Mattson *et al.*, 2017). A esto se une el hecho de que las extracciones de LCE requieren de un procedimiento invasivo (*i.e.*, punción lumbar) realizado por personal especializado, aspecto muy limitante si se desean utilizar estos marcadores en muestras amplias y/o en individuos asintomáticos (Menéndez-González, 2004). Existe, por tanto, un importante reto a la hora de incorporar marcadores de A β a partir de otro tipo de fluidos periféricos, *e.g.*, plasma, saliva u orina, que puedan obtenerse mediante procedimientos menos invasivos y que generen resultados más reproducibles.

Mediante la tomografía por emisión de positrones (PET) y el uso de trazadores radioactivos específicos, es posible determinar *in vivo* si el cerebro de un paciente muestra una carga patológica de A β fibrilar así como la distribución regional de estos agregados. Estudios realizados con el trazador *Pittsburgh Compound B* (PiB, siglas en inglés) han permitido diferenciar a pacientes con EA de controles, siendo el precúneo, el cíngulo posterior y las cortezas frontales y temporales las regiones que más carga de A β muestran en los pacientes con EA, y la corteza sensorimotora la que menos (Klunk *et al.*, 2004; Rowe *et al.*, 2007). Además, estos trabajos han confirmado que el A β comienza a agregarse décadas antes de que aparezcan los primeros síntomas de la EA (Jack *et al.*, 2013; Villemagne *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos con el PET de A β se corresponden con los derivados de tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA, mostrando una sensibilidad del 88-98% y una especificidad del 88-100% para detectar placas de A β (Clark *et al.*, 2012; Curtis *et al.*, 2015; Sabri *et al.*, 2015). Por otra parte, estudios longitudinales han revelado que la retención de A β cerebral determinada mediante diferentes radiotrazadores de PET predice la progresión de DCL a EA (Ong *et al.*, 2015). Las evidencias sugieren además que los resultados obtenidos con PET de A β guardan una alta correspondencia con los niveles patológicos de A β_{1-42} en LCE, hallazgos que comienzan a evidenciarse 15 años antes del inicio clínico de la EA (Buchhave *et al.*, 2012; Fleisher *et al.*, 2012; Benzinger *et al.*, 2013). Estos resultados han facilitado la incorporación de los marcadores de A β , obtenidos a partir de PET o LCE, como criterio para el diagnóstico de la EA en las fases preclínicas y prodrómica de la enfermedad (Jack *et al.*, 2010; Albert *et al.*, 2011; McKhann *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011; Dubois *et al.*, 2014), al menos en ámbitos de investigación.

1.1.4.2. Marcadores de neurodegeneración

Estudios previos han mostrado que los niveles totales de la proteína tau en LCE son 4-8 veces superiores en pacientes con EA que en controles (Khatoon *et al.*, 1992). Estos cambios resultan de la acumulación de la proteína tau en los axones neuronales, un proceso que además de alterar la actividad celular provoca la liberación de diferentes elementos del

citoesqueleto neuronal al LCE (Blennow *et al.*, 1995). Aunque los incrementos de tau en LCE tampoco son específicos de la EA, numerosos estudios han mostrado relaciones significativas entre los niveles de tau en LCE y la presencia de ONF en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA (e.g., Tapiola *et al.*, 1997; Buerger *et al.*, 2006).

Hasta hace muy poco tiempo, sólo era posible detectar los ONF mediante marcadores inmunohistoquímicos en tejido cerebral *post mortem*, o midiendo las concentraciones de proteína tau en LCE. Sin embargo, actualmente, existen marcadores de PET selectivos de tau (Villemagne *et al.*, 2015) que permiten detectar y cuantificar *in vivo* la retención cerebral de tau en humanos (Schöll *et al.*, 2017). Los estudios realizados con PET de tau han confirmado los hallazgos neuropatológicos de la EA, mostrando una correspondencia con los estadios de Braak y con la progresión del deterioro cognitivo que caracteriza a esta enfermedad (Lowe *et al.*, 2016; Schöll *et al.*, 2017).

Otro marcador de neurodegeneración ampliamente utilizado en las fases prodrómica y clínicas de la EA es el PET de glucosa (PET-FDG), dadas las relaciones existentes entre el hipometabolismo cerebral y la disminución de la densidad sináptica (Rocher *et al.*, 2003). En la EA leve, el consumo metabólico cerebral está significativamente reducido en la corteza entorrinal (Mosconi *et al.*, 2004) y el hipocampo (de Santi *et al.*, 2001), extendiéndose a la corteza cingulada posterior, áreas temporo-parietales, precúneo y corteza prefrontal en estadios más avanzados (Alexander *et al.*, 2002; Herholz *et al.*, 2002). En el caso de los pacientes con DCL, el patrón de hipometabolismo se extiende por las mismas regiones que en la EA (a excepción de la corteza frontal), aunque de manera menos prominente (Drzezga *et al.*, 2003; Nestor *et al.*, 2003; Mosconi *et al.*, 2005; Morbelli *et al.*, 2010; Bailly *et al.*, 2015), permitiendo discriminar los pacientes con DCL que convierten a EA de los controles con un 91% de precisión (Pagani *et al.*, 2014).

La neurodegeneración asociada a la EA se caracteriza por una disminución de la densidad sináptica, seguida de degeneración axonal y, en última instancia, de muerte neuronal (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Estos hallazgos no ocurren de manera tan temprana como los relacionados

con el A β , de ahí que la resonancia magnética (RM) estructural juegue un papel importante en la detección de la neurodegeneración incipiente durante las fases prodrómica y clínicas de la EA (Davatzikos *et al.*, 2008; Frisoni *et al.*, 2010). De hecho, los niveles de atrofia del hipocampo y de la corteza entorrinal han sido validados como marcadores de neurodegeneración asociados a la fase prodrómica de la EA (Jack *et al.*, 1999; Whitwell *et al.*, 2007). Además, estudios previos han mostrado que el grado de atrofia que sufre el hipocampo es mayor en pacientes con DCL que en personas mayores no dementes (Bottino *et al.*, 2002; Kantarci *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2006; Dickerson *et al.*, 2011) y que los pacientes con EA presentan un mayor nivel de atrofia que los DCL (Du *et al.*, 2001; Bottino *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2004).

1.2. Marcadores en sangre de la enfermedad de Alzheimer

Numerosos estudios han mostrado que las concentraciones en sangre de diferentes parámetros bioquímicos poseen utilidad de cara al diagnóstico y al pronóstico de determinadas enfermedades (Anderson & Anderson, 2002; Thadikkaran *et al.*, 2005). El interés por obtener biomarcadores a partir de sangre periférica es cada vez mayor, dada la facilidad y versatilidad que ofrece esta matriz biológica, que además incluye una buena reproducibilidad y sensibilidad para medir un gran número de metabolitos.

Han sido muchos los esfuerzos realizados hasta el momento para establecer un panel de biomarcadores de la EA obtenidos a partir de sangre periférica. Para ello, se han empleado diferentes aproximaciones genéticas y proteómicas, como los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), ensayos enzimáticos por colorimetría, inmunoensayos de inhibición turbidimétrica, inmunoensayos múltiples y ensayos de ciclo enzimático recombinante (Thambisetty & Lovestone, 2010; O'Bryant *et al.*, 2011). Los biomarcadores en sangre más utilizados en la EA son los relacionados con A β (Mayeux *et al.*, 2003; Sobów *et al.*, 2005; Pojlak *et al.*, 2016), metabolismo del colesterol (Yaffe *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2012), estrés oxidativo (Praticò *et al.*, 2002; Padurariu *et al.*, 2010), marcadores inmunológicos y de inflamación (Lanzrein *et al.*,

1998) marcadores de riesgo cardiovascular como la HCY (Seshadri *et al.*, 2002). Por su relación con los objetivos del presente trabajo, nos centraremos en los marcadores de A β , estrés oxidativo y HCY.

1.2.1. Marcadores de A β

Los diferentes péptidos de A β se expresan no solo en el sistema nervioso central sino también en el páncreas, riñón, bazo, corazón, hígado, testículos, aorta, pulmones, intestinos, piel, y en las glándulas adrenales, salivares y tiroideas (Selkoe *et al.*, 1988; Joachim *et al.*, 1989). En condiciones normales, las concentraciones cerebrales de A β soluble son aproximadamente 6 veces más elevadas que en el plasma sanguíneo (Bates *et al.*, 2009). La eficiencia catabólica de los péptidos de A β en sangre podría deberse al papel del hígado, órgano que se encarga de su absorción y degradación, razón que explicaría las bajas concentraciones de A β en sangre en comparación con las observadas en el LCE (Ghisso *et al.*, 2004).

Los péptidos de A β son transportados bidireccionalmente a través de la BHE, de ahí que se haya sugerido la existencia de un equilibrio fisiológico entre el A β cerebral y el circulante en sangre periférica (Shibata *et al.*, 2000). El principal receptor para transportar A β desde el cerebro a la sangre es LRP1, y desde la sangre al cerebro es el receptor para los productos de glicación avanzada (*receptor for advanced glycation end products*; RAGE, siglas en inglés) (Shibata *et al.*, 2000; Deane *et al.*, 2004). En condiciones normales, la forma soluble de LRP1 secuestra alrededor del 70-90% del A β plasmático (Sagare *et al.*, 2007). Sin embargo, en la EA, los niveles de LRP1 plasmáticos que se unen al A β están reducidos hasta en un 30% en comparación con los controles, facilitando el incremento del A β circulante (Sagare *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2013). Aunque se desconocen los mecanismos por los que el LRP1 soluble podría contribuir a la EA, las concentraciones de LRP1 soluble son capaces de identificar a los pacientes con EA y distinguirlos de controles y de otros pacientes con demencias no degenerativas con una sensibilidad del 77,8% y una especificidad del 85,7% y 93,3%, respectivamente (Liang *et al.*, 2013).

Las concentraciones de A β en sangre pueden verse afectadas por una amplia gama de factores que dificultan la comparación de resultados entre estudios. Por ejemplo, la edad, el genotipo *APOE*, y los mecanismos de producción (e.g., plaquetas) y eliminación (e.g., hígado) encabezarían la lista de factores no modificables. Algunos elementos de la dieta también podrían afectar a los niveles de A β , como la ingesta de cafeína (Cao *et al.*, 2009) o las dietas ricas en grasas saturadas y trans que incrementan los niveles de colesterol (Burgess *et al.*, 2006). Además, el consumo de algunos medicamentos como la insulina y posiblemente las estatinas modifican los niveles de A β en plasma (Blasko *et al.*, 2005). Por otra parte, trabajos recientes han puesto de manifiesto que la expresión de A β presenta una ritmicidad circadiana, con picos de concentración extracelular en vigilia y valles durante el sueño (Bateman *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009). De ahí que se haya postulado que las alteraciones del sueño que presentan los pacientes con EA sean uno de los factores que faciliten la acumulación de A β cerebral (Kang *et al.*, 2009; Lucey & Bateman, 2014) y retroalmente la progresión de la enfermedad (Gerstner *et al.*, 2012). De hecho, estudios previos realizados en humanos y roedores han mostrado que las concentraciones de A β aumentan tras la privación de sueño o por alteraciones en la señalización de la orexina (Kang *et al.*, 2009; Slats *et al.*, 2012; Liguori *et al.*, 2014), un neuropéptido que promueve el estado de vigilia (Hagan *et al.*, 1999).

En modelos murinos de la EA, se ha observado que las concentraciones de A β_{1-40} y A β_{1-42} en plasma y en LCE incrementan con la edad, pero disminuyen cuando ambos péptidos comienzan a acumularse en el cerebro (Kawarabayashi *et al.*, 2001; Izco *et al.*, 2014), aspecto que probablemente facilite la aparición del deterioro cognitivo que caracteriza a la EA (Näslund *et al.*, 2000). En humanos, los niveles plasmáticos de A β_{1-40} y A β_{1-42} también incrementan progresivamente con la edad durante el envejecimiento (Fukumoto *et al.*, 2003; Mayeux *et al.*, 2003; Blasko *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008). Sin embargo, la literatura sobre marcadores plasmáticos de A β en la EA es especialmente contradictoria. Por ejemplo, diversos estudios han mostrado concentraciones significativamente más altas de A β_{1-42} (Assini *et al.*, 2004; Sobów *et al.*, 2005) en pacientes con DCL que en controles, mientras que otros trabajos han observado una disminución de los niveles de A β_{1-42} durante la progresión de DCL a EA (Sobów

et al., 2005; Pesaresi *et al.*, 2006). Resultados igualmente divergentes se han observado en relación con la ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, encontrándose tanto valores disminuidos (Lui *et al.*, 2010; Yaffe *et al.*, 2011) como aumentados (Mayeux *et al.*, 2003) en pacientes con EA. A esta controversia se añade que otros trabajos no observaron cambios en los niveles plasmáticos de $A\beta$ al comparar controles y pacientes con DCL/EA (Tamaoka *et al.*, 1996; Vanderstichele *et al.*, 2000; Fukumoto *et al.*, 2003). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las determinaciones de $A\beta$ en sangre periférica no pueden ser actualmente utilizadas como biomarcador de la EA. Sin embargo, es posible que la combinación de los niveles plasmáticos de $A\beta$ con otros marcadores de la EA incremente su capacidad para discriminar entre el envejecimiento normal y la fase prodrómica de la EA (Blasko *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011; Janelidze *et al.*, 2016; Poljak *et al.*, 2016).

1.2.2. Marcadores de estrés oxidativo

El oxígeno, aparte de ser un elemento imprescindible para la vida, también puede desencadenar, a partir de sus reacciones, numerosas enfermedades debido a una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (para una revisión, ver Valko *et al.*, 2016). Estas especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*; ROS, siglas en inglés), al igual que las de nitrógeno, se producen durante las reacciones del metabolismo celular en las mitocondrias y en los peroxisomas (Boveris & Chance, 1973). Existe un sistema de defensas antioxidantes capaz de controlar y prevenir los daños producidos por los radicales libres. Este sistema involucra a enzimas fabricadas por el propio organismo, como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (McCord & Fridovich, 1968; McCord *et al.*, 1971; Tappel, 1978), o a antioxidantes no enzimáticos de origen exógeno, como los derivados de las frutas y las verduras (*e.g.*, vitaminas C y E, betacarotenos, flavonoides y licopenos) (Rice-Evans & Miller, 1996). De manera general, este sistema contribuye a neutralizar los efectos de las ROS y con ello a aminorar el daño celular. Sin embargo, cuando el sistema de defensas antioxidantes se agota por un exceso de ROS, se produce un daño oxidativo que afecta a proteínas, lípidos y ADN (Pacifci & Davies, 1991; Ueda *et al.*, 1998).

El cerebro es especialmente vulnerable a los daños causados por las ROS, dada su escasa composición de antioxidantes y su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que son blanco de la peroxidación lipídica, aspectos que contrastan con la elevada demanda metabólica de este órgano (Christen, 2000). Estos procesos son de carácter epigenético y, por lo tanto, dichas alteraciones podrían ser tanto la causa como la consecuencia. De esta forma, la formación de ROS afectaría al ADN mitocondrial, a la integridad de la membrana celular y a diversos transportadores, produciendo alteraciones en la cadena transportadora de electrones y con ello un incremento en la formación de ROS mitocondrial (Moreira *et al.*, 2010).

Además, el daño oxidativo puede afectar a la homeostasis del retículo endoplasmático (RE), orgánulo celular responsable del plegamiento y procesamiento de las proteínas. Las alteraciones en los procesos de transcripción y traducción del ADN podrían desencadenar un mal plegamiento de las proteínas, facilitando su acumulación y la producción de estrés del RE (Malhotra & Kaufman, 2007). Con el fin de contrarrestar este fenómeno, la célula ha desarrollado una respuesta adaptativa ante el incremento de proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*; UPR, siglas en inglés) basada en la reparación de las proteínas dañadas y en la degradación de las proteínas irreparables. En el caso que la homeostasis proteica no se pudiera restablecer, se activaría un mecanismo de muerte celular mediante apoptosis (Ron & Walter, 2007).

Los pacientes con EA muestran un incremento significativo de elementos que facilitan la generación de ROS y dañan a moléculas específicas en el cerebro (Lovell *et al.*, 1995; Lyras *et al.*, 1997; Marcus *et al.*, 1998; Markesbery & Lovell, 1998), fenómeno probablemente causado por la neuroinflamación local y la activación microglial que producen los agregados de A β (Ayasolla *et al.*, 2004). Además, estudios realizados con cultivos celulares han confirmado que la acumulación de A β induce estrés en el RE y activa diversas vías de muerte celular a nivel mitocondrial (Costa *et al.*, 2010). De hecho, los trabajos realizados en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA han revelado que los niveles de estrés en el RE incrementan a medida que la enfermedad progresa (Hoozemans *et al.*, 2005).

Diferentes estudios han puesto de manifiesto una correspondencia entre el incremento de estrés oxidativo celular y la disminución de la capacidad antioxidante total (*Total Antioxidant Capacity*; TAC, siglas en inglés) en sangre periférica (Chi *et al.*, 2002; Fenkci *et al.*, 2003; Andriollo-Sanchez *et al.*, 2005; Aycicek *et al.*, 2005; Amirkhizi *et al.*, 2010; Venturini *et al.*, 2010; Moslemnezhad *et al.*, 2016). Una disminución de la TAC refleja una reducción de determinados antioxidantes, siendo el superóxido dismutasa y el peróxido de glutatión las especies que han mostrado una disminución más evidente en pacientes con DCL/EA (Rinaldi *et al.*, 2003). Numerosos trabajos han confirmado que la TAC en sangre periférica está significativamente disminuida en pacientes con EA (Repetto *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2001; Kharrazi *et al.*, 2008; Aldred *et al.*, 2010; Cristalli *et al.*, 2012; Moslemnezhad *et al.*, 2016), tendencia que se observa desde la fase prodrómica de la enfermedad (Guidi *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2016), y se exagera con la presencia del genotipo *APOE4* (Pulido *et al.*, 2005) y con la evolución de la enfermedad (Zafrilla *et al.*, 2006). Estos resultados también correlacionan con hallazgos obtenidos en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con DCL/EA (Keller *et al.*, 2005; Lovell & Markesbery, 2008; Ansari & Scheff, 2010; Bruce-Keller *et al.*, 2010; Barone *et al.*, 2012).

1.2.3. Homocisteína

La HCY es un producto del metabolismo de la metionina (MET), un aminoácido esencial derivado de las proteínas de los alimentos (Refsum *et al.*, 2004). La concentración plasmática de HCY total integra a todas las formas circulantes de HCY, incluyendo la que se une a proteínas (80%), la que no se une a proteínas (1%) y la que forma dímeros de HCY o cisteína para dar lugar a la forma disulfuro cisteína-homocisteína (Jakubowski, 2014). De manera general, la MET se transforma en HCY mediante reacciones enzimáticas de transmetilación y mantiene su equilibrio plasmático a través de dos mecanismos, la *remetilación* al aminoácido esencial MET (completando así el ciclo de la MET) o la *transulfuración* al aminoácido sulfurado cisteína a través de la cistationina (Obeid & Herrmann, 2006). Las vitaminas B6 y B12 actúan como coenzimas en el metabolismo de la MET y de la HCY, y la deficiencia de alguna de estas vitaminas produce un incremento en los niveles plasmáticos de HCY (Jakubowski, 2014).

Las variaciones que se producen en las concentraciones de HCY son muy similares en LCE y en plasma; sin embargo, las concentraciones séricas son entre 20-100 veces más altas que en LCE (Obeid & Herrmann, 2006). A partir de la pubertad, los hombres muestran concentraciones de HCY más elevadas que las mujeres, aunque estas diferencias de género se van diluyendo con la edad (Jacques *et al.*, 1999). Durante el envejecimiento, los niveles de HCY incrementan (Herrmann *et al.*, 1999; Obeid *et al.*, 2004). Estos pueden verse afectados por factores muy diversos entre los que destacan portar determinados polimorfismos en los genes MTHFR y C677T, tabaquismo, consumo excesivo de café y/o alcohol, vida sedentaria, diabetes, función tiroidea, medicamentos anti-folatos y antagonistas de la vitamina B12/B6, y la presencia de enfermedades reumatológicas o infecciosas (para una revisión ver Kulkarni & Richard, 2003; Refsum *et al.*, 2004). La mayoría de estos factores alteran las funciones y/o modifican las concentraciones de las vitaminas B12 y B9 en sangre periférica (Refsum *et al.*, 2004), principales determinantes de los niveles circulantes de HCY.

Los niveles elevados de HCY se han asociado con la progresión del deterioro cognitivo que presentan los pacientes con EA (Bottiglieri *et al.*, 2001; Seshadri *et al.*, 2002; Ravaglia *et al.*, 2005). De hecho, en modelos animales, se ha observado que el incremento de HCY cerebral correlaciona con la aparición de disfunciones cognitivas y daño neuronal (Streck *et al.*, 2004; Algaidi *et al.*, 2005), así como con las alteraciones en el metabolismo cerebral (Streck *et al.*, 2003). Los mecanismos mediante los cuales los niveles elevados de HCY incrementan el riesgo de desarrollar EA podrían estar relacionados con daños directos al sistema redox (Ho *et al.*, 2001; Streck *et al.*, 2003; Zou & Banerjee, 2005) y con incrementos de la respuesta de estrés del RE (Outinen *et al.*, 1999; Sai *et al.*, 2002; Chigurupati *et al.*, 2009). Ambos mecanismos podrían facilitar la producción y agregación del A β (Pacheco-Quinto *et al.*, 2006; Zhuo *et al.*, 2010; Li & Praticò, 2015; Chung *et al.*, 2016) y/o la hiperfosforilación de tau (Sontag *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008), lo cual, en último extremo, contribuiría a incrementar el daño cerebrovascular (Hogervorst *et al.*, 2002; Faraci & Lentz *et al.*, 2004; Troen *et al.*, 2008) y, probablemente, a promover los patrones de atrofia cerebral que presentan los pacientes con

DCL/EA (Hogervorst *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Rajagopalan *et al.*, 2011; Douaud *et al.*, 2013; Madsen *et al.*, 2015).

1.3. El sueño en la enfermedad de Alzheimer

Como parte del proceso de envejecer se producen alteraciones en los ritmos circadianos que controlan muchas de las funciones vitales. Entre estos ritmos, el más afectado es el ciclo vigilia-sueño (Foley *et al.*, 1995; Monk & Kupfer, 2000), cuyas alteraciones se manifiestan con un incremento en la latencia del comienzo del sueño (Weitzman *et al.*, 1982) y muy especialmente, con una disminución de la duración del sueño (Huang *et al.*, 2002a), parámetro este último estrechamente relacionado con el deterioro de la memoria que sufren las personas mayores (Tsapanou *et al.*, 2017). En la EA, estas alteraciones se exacerbaban de manera significativa. Así, se estima que el 25-40% de los pacientes con EA leve o moderada sufren insomnio, agitación nocturna y/o somnolencia diurna excesiva, que correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Witting *et al.*, 1990; Bliwise *et al.*, 1995; van Someren, 1996; Moran *et al.*, 2005; Wu & Swaab, 2007; Beaulieu-Bonneau *et al.*, 2009; D'Onofrio *et al.*, 2012). De hecho, estudios previos han revelado que la somnolencia diurna excesiva incrementa el riesgo de sufrir EA (Benito-León *et al.*, 2009). En las fases más avanzadas de la enfermedad son frecuentes las alteraciones severas del ritmo vigilia-sueño, llegando a invertirse los periodos de vigilia y sueño en casos extremos (Vitiello *et al.*, 1990; Ancoli-Israel *et al.*, 1997).

Estudios polisomnográficos (PSG) realizados en pacientes con EA han mostrado una disminución en la densidad de husos de sueño, sobre todo de los husos rápidos en regiones parietales (Gorgoni *et al.*, 2016), un incremento de la duración y frecuencia de los despertares nocturnos, y una reducción del sueño de ondas lentas (SOL) y de la fase REM (Loewenstein *et al.*, 1982; Prinz *et al.*, 1982; Vitiello *et al.*, 1990; Petit *et al.*, 1993; Moe *et al.*, 1995; Vitiello & Borson, 2001; Bombois *et al.*, 2010), cambios que explicarían tanto la disminución de la duración del sueño (Gagnon *et al.*, 2006) como las manifestaciones de somnolencia diurna mencionadas anteriormente (Bonanni *et al.*, 2005), e incluso el deterioro de la memoria al

interferir con los procesos de consolidación que operan durante el sueño (Westerberg *et al.*, 2012). Estas alteraciones del sueño han mostrado adquirir una mayor relevancia clínica a medida que la enfermedad progresa (Moe *et al.*, 1995; Bonanni *et al.*, 2005), siendo uno de los factores que contribuyen a la institucionalización del paciente (Pollak & Perlick, 1991), lo que a su vez podría exacerbar las alteraciones del ritmo vigilia-sueño (van Someren *et al.*, 1996) y acelerar el deterioro (Wilson *et al.*, 2007).

Aunque las alteraciones del sueño son especialmente incapacitantes en las fases más avanzadas de la EA (Ancoli-Israel *et al.*, 1997), están presentes desde estadios tempranos. Así, estudios recientes han mostrado que los pacientes con DCL muestran un acortamiento del SOL y una disminución de la densidad de husos de sueño (Westerberg *et al.*, 2012), junto con una mayor fragmentación del SOL y una disminución del porcentaje de sueño REM, aspecto este último que se ve exacerbado por la presencia del genotipo *APOE4* (Hita-Yáñez *et al.*, 2012). Estas alteraciones de la estructura del sueño son también percibidas a nivel subjetivo por los pacientes con DCLa (Hita-Yáñez *et al.*, 2013).

Se desconoce, sin embargo, si las alteraciones del sueño que caracterizan al DCL (Westerberg *et al.*, 2012; Hita-Yáñez *et al.*, 2012) están relacionadas con cambios en las concentraciones plasmáticas de A β , y si éstas a su vez están asociadas con disminuciones de la integridad cortical en regiones afectadas por la EA. Tampoco existen evidencias que relacionen dichas alteraciones del sueño con otros marcadores en sangre periférica que correlacionan con la patología de la EA, como son los niveles de HCY y el estado oxidativo. En el presente trabajo de Tesis, trataremos de arrojar luz sobre estos aspectos con el objetivo de entender mejor la relación entre las alteraciones del sueño y otros marcadores que caracterizan a la fase prodrómica de la EA.

2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2. PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Planteamiento general de los objetivos

Numerosas evidencias sugieren que la cascada neuropatológica que subyace a la EA comienza décadas antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos (Buchhave *et al.*, 2012; Fleisher *et al.*, 2012; Benzinger *et al.*, 2013), lo que ha facilitado la caracterización biológica de las fases preclínicas y prodrómica de esta condición neurodegenerativa. A pesar de los importantes avances realizados hasta la fecha, los principales problemas con la EA siguen siendo la escasa sensibilidad y especificidad de los diferentes biomarcadores para confirmar su diagnóstico (Mattsson *et al.*, 2012) y la ausencia de una terapia eficaz que frene el deterioro cognitivo progresivo que muestran estos pacientes (Mikulca *et al.*, 2014; Rosenblum, 2014; Hamm *et al.*, 2015; Gauthier *et al.*, 2016). En un intento por aproximar el primer problema, se han propuesto recientemente nuevos criterios diagnósticos que incorporan biomarcadores asociados a cada estadio de la EA (Jack *et al.*, 2010; Albert *et al.*, 2011; McKhann *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011). Esto ha permitido, al menos en contextos de investigación, detectar daños incipientes en estadios asintomáticos y realizar un seguimiento más cercano de estos casos, dado el elevado riesgo de que evolucionen a EA en los siguientes años.

Aunque las alteraciones del sueño están presentes en la fase prodrómica (Hita-Yáñez *et al.*, 2012; Westerberg *et al.*, 2012) y continúan agravándose en las fases clínicas de la EA (Loewenstein *et al.*, 1982; Prinz *et al.*, 1982; Vitiello *et al.*, 1990; Petit *et al.*, 1993; Moe *et al.*, 1995), se desconoce si dichas alteraciones guardan relación con la patología que subyace a la enfermedad. La importancia de este aspecto no es menor, ya que de confirmarse tal asociación se podría evaluar si la presencia de alteraciones del sueño en personas mayores con déficits de memoria, en combinación con otros biomarcadores, incrementa la capacidad para predecir la progresión de la EA.

Estudios realizados en modelos transgénicos de la EA y en personas asintomáticas que presentan mutaciones de PS1 han puesto de manifiesto que las alteraciones del ciclo vigilia-sueño y la acumulación de A β cerebral se retroalimentan mutuamente (Kang *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2012), por lo que las alteraciones del sueño podrían ser un evento temprano en el curso de la enfermedad (Gerstner *et al.*, 2012). En línea con esta hipótesis, resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que los pacientes con DCLa presentan alteraciones de la estructura del sueño objetivables mediante polisomnografía (PSG) (Hita-Yáñez *et al.*, 2012), que además correlacionan con las quejas subjetivas de sueño autoinformadas (Hita-Yáñez *et al.*, 2013). Se desconoce, sin embargo, si estas alteraciones del sueño están relacionadas con marcadores de amiloidosis y neurodegeneración. Por ello, **el primer objetivo de esta Tesis fue evaluar si las alteraciones del sueño que presentan los pacientes con DCLa están relacionadas con las concentraciones plasmáticas de A β (A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂, ratio A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀) y/o con los cambios en el espesor cortical, y si esta última asociación es o no independiente de los niveles plasmáticos de A β .**

Como se ha avanzado en la introducción, otros marcadores en sangre periférica, como el estado oxidativo (Repetto *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2001; Kharrazi *et al.*, 2008; Aldred *et al.*, 2010; Cristalli *et al.*, 2012; Moslemnezhad *et al.*, 2016) y los niveles de HCY (Clarke *et al.*, 1998; McCaddon *et al.*, 1998; Bottiglieri *et al.*, 2001; Seshadri *et al.*, 2002; Miwa *et al.*, 2016) podrían interaccionar con la fisiología del sueño y exacerbar la evolución de la EA. En línea con esta hipótesis, se ha observado que el incremento de las concentraciones periféricas de HCY se acompaña de daños oxidativos (Tyagi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013b) y promueve la agregación de A β (Pacheco-Quinto *et al.*, 2006; Zhuo *et al.*, 2010; Li & Praticò, 2015; Chung *et al.*, 2016), aspecto que, en último extremo, podría contribuir al patrón de atrofas cerebrales que muestran los pacientes con DCL/EA (Hogervorst *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Rajagopalan *et al.*, 2011; Douaud *et al.*, 2013; Madsen *et al.*, 2015). Además, la privación de sueño ha mostrado incrementar la respuesta de estrés del RE (Naidoo *et al.*, 2008) y las concentraciones de A β en el fluido intersticial cerebral de ratones transgénicos (Kang *et al.*, 2009). Sobre la base de estos datos, **el segundo objetivo del presente trabajo fue**

investigar si las alteraciones del sueño que presentan los pacientes con DCLa están relacionadas con los niveles de HCY y TAC, si estos marcadores periféricos se relacionan con los cambios de la estructura cerebral, y si el sueño podría desempeñar un papel mediador en dicha relación.

2.2. Hipótesis sobre la relación del sueño con los niveles plasmáticos de A β y con el espesor cortical en pacientes con DCLa

i) Los avances en la neurociencia del sueño realizados en las últimas décadas han permitido establecer un marco de trabajo para validar hipótesis sobre el papel que juega el sueño en la salud mental (Hobson, 2002). Estudios realizados con diferentes modelos experimentales no sólo han confirmado que las alteraciones del sueño son una característica intrínseca de la EA (Loewenstein *et al.*, 1982; Prinz *et al.*, 1982; Vitiello *et al.*, 1990; Petit *et al.*, 1993; Moe *et al.*, 1995), sino que también han mostrado que dichas alteraciones se acompañan de un deterioro cognitivo que afecta de manera muy específica a la memoria (Graves *et al.*, 2001; Ganguly-Fitzgerald *et al.*, 2006; Abel *et al.*, 2013; Goel *et al.*, 2013). Las disfunciones cognitivas podrían estar determinadas por la acumulación de A β (Iijima *et al.*, 2004; Lesné *et al.*, 2006; Kittelberger *et al.*, 2012) y exacerbadas por las alteraciones del sueño (Antoniadis *et al.*, 2000; Covell *et al.*, 2012; Guarnieri & Sorbi, 2015), factores que conjuntamente podrían acelerar la patofisiología de la EA (Kang *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2012).

A pesar de la conveniencia de emplear marcadores en sangre periférica para la detección temprana de la EA, la inconsistencia de resultados impide trasladar estos marcadores a la clínica (Figurski *et al.*, 2012; Toledo *et al.*, 2013; Sutphen *et al.*, 2014). Evaluar por tanto la asociación entre los niveles plasmáticos de A β y otros patrones fisiológicos, como por ejemplo la estructura del sueño, podría proporcionar un valor añadido a estos marcadores periféricos que, por sí solos, son manifiestamente insuficientes en contextos clínicos.

Como se ha mencionado en la introducción, el A β muestra variaciones circadianas, siendo las concentraciones más elevadas durante la vigilia y alcanzando sus niveles más bajos

durante el sueño (Bateman *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando el A β comienza a agregarse, comienza a fallar también la regulación circadiana de las concentraciones cerebrales de A β y del ciclo vigilia-sueño (Roth *et al.*, 2012). Ello explica en gran medida que las alteraciones del ciclo vigilia-sueño se acompañen de un incremento en las concentraciones de A β cerebral y que dicho incremento suponga periodos de vigilia más largos y periodos de sueño más cortos (Kang *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2012; 2014; Ju *et al.*, 2013; Spira *et al.*, 2013; Ooms *et al.*, 2014; Sprecher *et al.*, 2015; Tabuchi *et al.*, 2015; Branger *et al.*, 2016), un círculo vicioso que podría facilitar o acelerar la progresión de la EA (Gerstner *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2014; Lucey & Bateman, 2014). Sin embargo, se desconoce si esta relación puede evidenciarse igualmente con las concentraciones plasmáticas de A β y si es extrapolable a pacientes con DCLa. Dado que los pacientes con DCLa presentan un sueño alterado (Hita-Yáñez *et al.*, 2012; Westerberg *et al.*, 2012) y niveles circulantes de A β_{1-42} elevados (Assini *et al.*, 2004; Sobów *et al.*, 2005), nuestra hipótesis es que ambos fenómenos podrían estar relacionados.

ii) Si las alteraciones del sueño y la patología amiloidea van de la mano durante el curso de la EA, es posible que también se acompañen de una disminución de la sustancia gris (SG) en regiones corticales afectadas por la EA. Esta hipótesis se sustenta en estudios que muestran que los adultos jóvenes y las personas mayores que informan de una mala calidad de sueño presentan una reducción de volumen de la SG en regiones de la corteza orbitofrontal, áreas frontales mediales, cíngulo posterior, precúneo e hipocampo (Riemann *et al.*, 2007; Alteni *et al.*, 2010; Killgore *et al.*, 2012; Mander *et al.*, 2013; Joo *et al.*, 2014). Algunas de estas áreas cerebrales no solo se muestran especialmente vulnerables a las deposiciones de A β (Buckner *et al.*, 2005) sino que además participan en la generación de las ondas lentas del sueño no REM (Murphy *et al.*, 2009). Sobre la base de estos datos se espera, por tanto, que las alteraciones del sueño en los pacientes con DCLa estén asociadas a disminuciones del espesor cortical en aquellas regiones en las que típicamente se produce una mayor concentración de agregados de A β . No obstante, dado que el A β plasmático no guarda una relación directa con la distribución topográfica del A β cerebral, la

relación entre el sueño y el espesor cortical podría ser independiente de las concentraciones plasmáticas de A β .

2.3. Hipótesis sobre la relación entre el sueño, los niveles de homocisteína y el estado antioxidante en pacientes con DCLa

Estudios previos han mostrado que tanto el incremento de los niveles de HCY (Dickhout *et al.*, 2007; Belal *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2016) como la privación de sueño (Naidoo, 2009; Brown *et al.*, 2014; Hakim *et al.*, 2015) aumentan la respuesta de estrés del RE. De hecho, los niveles elevados de HCY están considerados como un factor de riesgo para desarrollar diferentes condiciones neurodegenerativas (Clarke *et al.*, 1998; McCaddon *et al.*, 1998; Seshadri *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2015; Miwa *et al.*, 2016) debido a que facilitan la entrada excesiva de calcio a la célula, la acumulación de A β y tau, y promueven la muerte neuronal (Ho *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2013). Por lo tanto, y de forma indirecta, los niveles elevados de HCY podrían contribuir a los patrones de atrofia cerebral que caracterizan a la EA (Hogervorst *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009; Madsen *et al.*, 2015).

Los pacientes con DCL presentan incrementos en las concentraciones de HCY y reducciones significativas de la TAC (Guidi *et al.*, 2006), una relación que pensamos podría estar mediada por la duración del periodo de sueño. Esta hipótesis se sustenta en los siguientes hallazgos: i) los niveles elevados de HCY están relacionados con la disminución del tiempo total de sueño (Martins *et al.*, 2003; Rajendiran *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016); ii) la privación de sueño es un potente estresor oxidativo (D'Almeida *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Mathangi *et al.*, 2012; Villafuerte *et al.*, 2015); y iii) la acumulación de placas de A β mantiene relaciones recíprocas con el sueño (Ju *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015; Musiek *et al.*, 2015; Roh *et al.*, 2015) y con el estrés oxidativo (Guglielmotto *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sujetos

En los experimentos que integran la Tesis participaron 21 personas mayores neurológica y cognitivamente normales (grupo control) y 21 pacientes con deterioro cognitivo leve de tipo amnésico (DCLa). La muestra experimental fue reclutada en el Laboratorio de Neurociencia Funcional (Universidad Pablo de Olavide, Sevilla) y en la Unidad de Demencias del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Todos los participantes firmaron voluntariamente un consentimiento informado previamente a su inclusión en el estudio. Los protocolos experimentales empleados en esta investigación fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación de la Universidad Pablo de Olavide y por el Comité de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Todos los procedimientos empleados respetaron los principios de la Declaración de Helsinki relacionados con la investigación en humanos (1975, revisados en 2000).

El diagnóstico de DCLa se basó en los criterios propuestos por Petersen y colaboradores (1999): i) presencia de quejas subjetivas de memoria preferiblemente corroboradas por el acompañante; ii) deterioro objetivo de la memoria confirmado mediante pruebas neuropsicológicas (1,5 desviaciones estándar inferiores a la media establecida para la edad del sujeto), entre las que se incluyeron la versión española de los subtests de Memoria Lógica de la Escala de Memoria de Wechsler (3ª Edición), el Test de Denominación de Boston (*Boston Naming Test*; validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009a), el Trail Making Test (validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009b), el Test de la Figura Compleja de Rey-Osterrieth (validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009c) y la batería de Percepción Espacial y Visual de Objetos (*Visual Object and Space Perception Battery*; validación española, Peña-Casanova *et al.*, 2009d); iii) puntuación global de 0,5 (demencia cuestionable) en la Escala de Demencia Clínica (*Clinical Dementia Rating*; CDR, siglas en inglés) (Hughes *et al.*, 1982); iv) mostrar un nivel de independencia normal de acuerdo con la Escala para el Deterioro

de las Actividades de la Vida Diaria (validación española, Böhm *et al.*, 1998); y v) no cumplir los criterios de demencia establecidos en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 4ª versión (DSM-IV; American Psychiatric Association, 1994).

Los criterios de inclusión para los sujetos del grupo control fueron: i) ausencia de un deterioro objetivo de la memoria, aspecto que fue evaluado con las mismas pruebas neuropsicológicas que se emplearon en los pacientes con DCLa; ii) una puntuación global de 0 (ausencia de demencia) en el CDR (Hughes *et al.*, 1982); y iii) mostrar un nivel de independencia normal, aspecto que fue evaluado con la misma escala que se utilizó en los pacientes con DCLa.

Todos los participantes se sometieron a pruebas de laboratorio (hemograma, vitamina B12/folato y función tiroidea), a una exploración neurológica y a un estudio de RM de cráneo que incluyó secuencias ponderadas en T1, T2 y FLAIR. Con el objetivo de determinar el nivel subjetivo de somnolencia diurna de cada sujeto, se administró la Escala de Somnolencia de Epworth (ESS, validación española, Ferrer *et al.*, 1999). A partir de los resultados obtenidos en estas pruebas, se establecieron los siguientes criterios de exclusión para todos los participantes: i) mostrar en el Mini Examen Cognoscitivo (*Mini-Mental State Examination*, MMSE, siglas en inglés; validación española, Lobo *et al.*, 1980) puntuaciones ≤ 22 en los DCLa y ≤ 26 en controles; ii) presentar puntuaciones ≥ 5 en la versión abreviada de la Escala de Depresión Geriátrica (Yesavage *et al.*, 1983); iii) mostrar lesiones macroscópicas en la RM (*e.g.*, tumores cerebrales, esclerosis del hipocampo, malformaciones vasculares y/o infartos cerebrales extensos); iv) presentar isquemias relevantes en la sustancia blanca periventricular y/o profunda, utilizándose como valor de corte puntuaciones ≥ 2 en la Escala de Cambios en la Sustancia Blanca Relacionados con la Edad (Fazekas *et al.*, 1987); v) presentar un historial clínico de enfermedades neurológicas (*e.g.*, infarto cerebral, epilepsia, traumatismo craneoencefálico), psiquiátricas (*e.g.*, depresión, psicosis, historia de consumo crónico de alcohol y/o de otras sustancias que afecten al sistema nervioso) o de cualquier otra índole (*e.g.*, renal, hepática, pulmonar y/o endocrina); vi) estar en tratamiento con medicación que afecte a la función cognitiva y/o al ciclo vigilia-sueño (*e.g.*, hipnóticos benzodiazepínicos o no benzodiazepínicos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptación de serotonina,

inhibidores de la acetilcolinesterasa, etc.); y vii) sufrir trastornos respiratorios y/o motores durante el sueño, o presentar alteraciones en los ritmos circadianos como consecuencia de turnos de trabajo nocturnos, etc., aspecto que fue corroborado mediante historia clínica y por el acompañante (pareja, cuidador o familiar más cercano).

3.2. Determinación de parámetros en sangre periférica

Cada participante acudió por la mañana en ayunas a la Unidad de Biomarcadores del Laboratorio de Neurociencia Funcional (Universidad Pablo de Olavide) para proceder a la extracción de sangre. Para la determinación de A β en plasma, las muestras de sangre fueron tomadas en tubos Vacutainer[®] de 10 ml con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) potásico (BD Diagnostics) y posteriormente centrifugadas a 3.500 r.p.m. durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante fue alícuotado en cantidades de 250 μ l en tubos de polipropileno añadiendo 8,32 μ L de inhibidor de proteasas (cOmplete Ultra Tablets mini, Roche). Las muestras se almacenaron a -80°C y se descongelaron antes de cada ensayo.

Para la determinación de la TAC, ácido úrico y HCY se utilizaron muestras de suero tomadas en tubos Vacutainer[®] de 8,5 ml (SST II *Advance*, BD Diagnostics). Una vez se coagularon las muestras de sangre, fueron centrifugadas a 3.500 r.p.m. durante 15 min. a 4°C. Finalmente, se realizaron alícuotas de 250 μ l en tubos de polipropileno y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.2.1. Determinación de las concentraciones plasmáticas de A β

Para la determinación de los niveles de A β_{1-40} y A β_{1-42} en plasma se realizaron ensayos de ELISA "sándwich" con kits de Invitrogen (referencia KHB3481 para A β_{1-40} y KHB3544 para A β_{1-42}). Brevemente, las muestras fueron descongeladas hasta alcanzar una temperatura de 4°C y, posteriormente, se añadieron 50 μ l de plasma a cada pocillo por duplicado. Se incluyó también una muestra control por duplicado en cada placa para evaluar la variabilidad entre

experimentos. El protocolo comenzó con una incubación durante 17 horas a 4°C con el anticuerpo *Hu* A β_{1-40} o A β_{1-42} , para continuar al día siguiente con el resto de pasos propuestos por el fabricante. A continuación, se midieron las absorbancias a 450 nm y se obtuvieron las concentraciones de A β_{1-40} y A β_{1-42} (pg/ml) utilizando un lector de placas VICTOR™ X3 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Los coeficientes de variación de los diferentes ensayos de ELISA estuvieron por debajo del 10%. Finalmente, se calculó la ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} que ha mostrado ser útil para identificar a personas mayores en alto riesgo de desarrollar EA (Graff-Radford *et al.*, 2007). Los límites de detección para estos ensayos ELISA fueron de 0,52 pg/ml para A β_{1-40} y 0,27 pg/ml para A β_{1-42} .

3.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante (TAC)

Para determinar el estado antioxidante en las muestras de suero de cada participante, se utilizó una técnica capaz de detectar la absorción de radicales de oxígeno (*oxygen radical absorbance capacity*, ORAC, siglas en inglés) (Cao & Prior, 1998). Esta técnica cuantifica la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (fluoresceína) al mezclarse con un generador de radicales libres (AAPH: 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro). Cuantos más antioxidantes contenga la muestra de suero, mayor será la transferencia de átomos de hidrógeno a los radicales libres para preservar la estructura de la fluoresceína (Ou *et al.*, 2001). Para evitar que las proteínas contenidas en la muestra enmascarasen los antioxidantes de bajo peso molecular, empleamos un protocolo en suero desproteinizado con ácido perclórico (ORAC_{PCA}) (Prior *et al.*, 2003).

La técnica ORAC presenta ciertas ventajas en comparación con otros métodos utilizados para medir el estado antioxidante (Prior *et al.*, 2005). Por ejemplo, es el único procedimiento que basa sus mediciones en la fluorescencia, en vez de en la absorbancia, reduciéndose así la posibilidad de generar reacciones cruzadas entre los antioxidantes de la muestra y los reactivos (Cao & Prior, 1998). Además, esta técnica permite determinar la capacidad de todos los antioxidantes de la muestra (hidro y liposolubles) para capturar radicales libres, así como el

tiempo que tarda en conseguirlo (Dávalos *et al.*, 2003). Finalmente, cabe destacar que ORAC es un método adaptado al formato de placas multipocillo, lo que permite un mejor rendimiento y una menor probabilidad de errores, debido, por ejemplo, a las variaciones de temperatura, parámetro crucial en este ensayo (Huang *et al.*, 2002b).

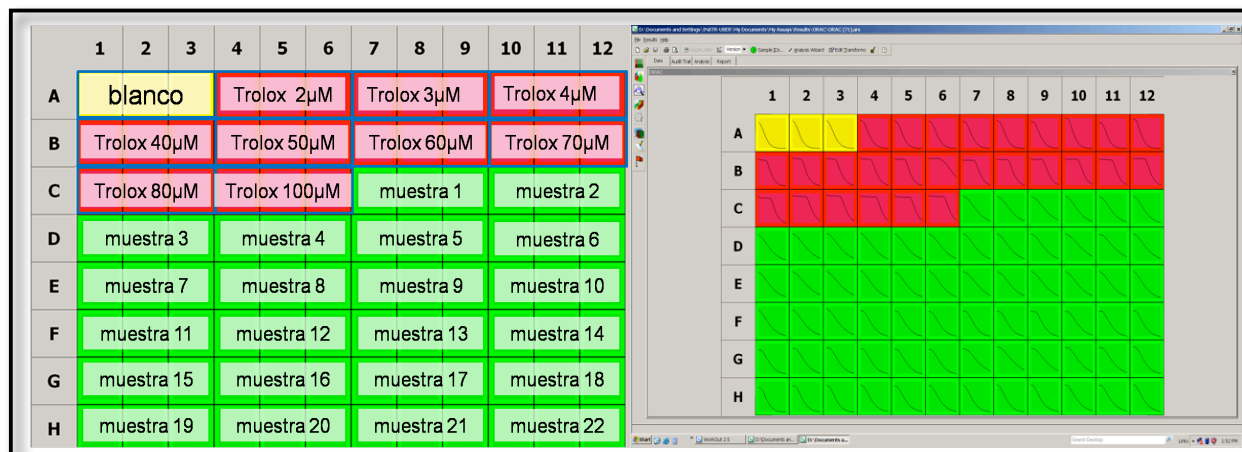


Figura 5. Montaje del ensayo ORAC. Todas las reacciones se obtuvieron por triplicado siguiendo el patrón mostrado en el panel de la izquierda. En el panel de la derecha, se muestra como todas las reacciones de la curva estándar y de las muestras de suero alcanzaron sus valores más bajos de fluorescencia transcurridos 30 min.

En el presente estudio, utilizamos la técnica ORAC siguiendo el procedimiento descrito por Ou *et al.* (2001) con ligeras modificaciones. Brevemente, las muestras/blanco/Trolox fueron disueltas con un tampón fosfato salino (PBS) de 5mM. Posteriormente, se mezclaron 200 µL de la muestra/blanco/Trolox con 120 µL de fluoresceína 70,3 nM y 60 µL de AAPH 12 mM en placas oscuras de 96 pocillos atemperadas a 37°C. Los niveles de fluorescencia se midieron a 37°C (longitud de onda de excitación 485 ± 14 nm, longitud de onda de emisión $535 \text{ nm} \pm 25$ nm) durante un período de 30 minutos a intervalos de 2 minutos, en un espectrofotómetro de fluorescencia equipado con una célula termostatizada (VICTOR™ X3, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Para calcular la curva estándar empleamos Trolox (ácido 6-hidroxi- 2,5,8-tetrametilchromano-2-carboxílico), un análogo hidrosoluble de la vitamina E ampliamente utilizado para determinar capacidad antioxidante en muestras biológicas (Benzie & Strain,

1996). Las concentraciones empleadas para cada punto de la curva fueron de 2 a 100 μM de Trolox. La **Figura 5** muestra el montaje de un ensayo de ORAC.

La técnica ORAC cuantifica la capacidad que tienen los antioxidantes de la muestra para impedir el daño que los radicales libres ejercen sobre una proteína fluorescente. Esta propiedad queda reflejada en el comportamiento cinético de la fluorescencia, que alcanza su punto máximo al inicio de la reacción. Conforme transcurre el tiempo y se van agotando los antioxidantes, la fluorescencia decae por completo hasta que la inhibición alcanza el 100% (Huang *et al.*, 2002b). El área bajo la curva resultante de este proceso se compara con la curva del blanco y los valores obtenidos se extrapolan a la recta patrón. Este cálculo se realizó automáticamente mediante el programa WorkOut 2.5 integrado en el lector de placas. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y las muestras cuyos coeficientes de variación superaron el 10% fueron repetidas. La pendiente de calibración empleada mostró un coeficiente R^2 superior a 0,94 en todos los ensayos. Los resultados de las determinaciones de la TAC fueron expresadas en $\mu\text{M/L}$ de Trolox.

El ácido úrico es un potente secuestrador de radicales libres que explica hasta un 60% de la capacidad antioxidante total de la muestra (Benzie & Strain, 1996). Para eliminar este factor de confusión de nuestros resultados, calculamos las concentraciones de ácido úrico en cada participante y las restamos de sus niveles de TAC. Estos resultados fueron los que finalmente se informaron en el presente trabajo. Las determinaciones de ácido úrico se realizaron mediante espectrofotometría (A15 Random Access Analyzer, Biosystems, España) utilizando reactivos a tal efecto (*Biosystems*, referencia 1251). Previamente a estas determinaciones, preparamos una curva de calibrado con un calibrador múltiple para bioquímicas (*Biosystems*, referencia 18011) y se realizaron los ensayos correspondientes para los controles y las muestras de suero (*Biosystems*, referencia 18903). Los resultados de las determinaciones de ácido úrico fueron expresadas en $\mu\text{M/L}$.

3.2.3. Determinación de las concentraciones de homocisteína (HCY)

Los niveles de HCY se determinaron con ensayos enzimáticos (Diazyme, referencias 20924 para el reactivo, 20925 para los calibradores y 20926 para los controles) mediante espectrofotometría (A15 Random Access Analyzer, Biosystems, España). Los resultados de las determinaciones de HCY fueron expresados en $\mu\text{M/L}$.

3.3. Registros de polisomnografía y clasificación de las fases del sueño

Los registros de polisomnografía (PSG) nocturna se realizaron en la Unidad de Neurofisiología del Laboratorio de Neurociencia Funcional (Universidad Pablo de Olavide). Los participantes recibieron instrucciones para que siguieran su rutina normal de actividades en la semana que precedió al estudio. Se les pidió además que no ingirieran bebidas alcohólicas durante las 24 horas previas al experimento y que tampoco durmieran siesta el día del estudio. Cada participante llegó al laboratorio sobre las 18:00h para cumplimentar diferentes cuestionarios de sueño y para proceder a la colocación de electrodos. La hora de comienzo de la PSG se adaptó a la hora habitual de acostarse de cada sujeto.

El protocolo de PSG incluyó 59 electrodos de electroencefalografía (EEG) (Fp1, Fp2, AF7, AF3, AFz, AF4, AF8, F7, F5, F3, F1, Fz, F2, F4, F6, F8, FT7, FC5, FC3, FC1, FCz, FC2, FC4, FC6, FT8, T7, C5, C3, C1, Cz, C2, C4, C6, T8, TP7, CP5, CP3, CP1, CPz, CP2, CP4, CP6, TP8, P7, P5, P3, P1, Pz, P2, P4, P6, P8, PO7, PO3, POz, PO4, PO8, O1 y O2), 4 electrodos de electrooculografía (EOG) para registrar movimientos oculares horizontales y verticales, y 2 electrodos de electromiografía (EMG) colocados en el mentón para registrar el tono muscular. Todos los electrodos de EEG se referenciaron al promedio de la actividad registrada en ambas mastoides. La posición de los electrodos EEG se estableció siguiendo el Sistema Internacional 10-10 (Jasper, 1958) y los valores de impedancia de todos ellos se mantuvieron por debajo de 5 K Ω . La **Figura 6** ilustra el protocolo de registro utilizado en el presente estudio.

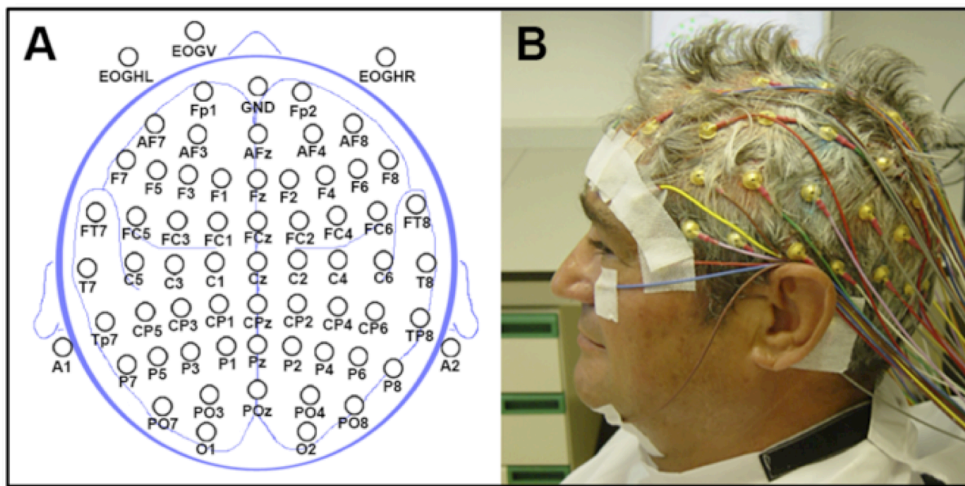


Figura 6. Montaje de PSG empleado en el presente estudio. **A.** Esquema de la posición de los electrodos EEG y EOG. EOGHL: electrodo de electrooculografía horizontal del ojo izquierdo; EOGHR: electrodo de electrooculografía horizontal del ojo derecho; EOGV: electrodo de electrooculografía vertical colocado debajo del ojo izquierdo referenciado al electrodo Fp1. **B.** Foto de un participante del estudio con el mencionado montaje.

Todas las medidas electrofisiológicas fueron realizadas con electrodos de copa de 10 mm de diámetro con una aleación de oro y longitud de cable de 152 cm (Grass, Inc., referencia FS-E5GH-60). Previamente a la colocación de cada electrodo, se frotó la zona de interés con un bastoncillo empapado en crema abrasiva para eliminar las células muertas y la grasa de la piel. Posteriormente, la copa del electrodo se rellenó con una pasta electrolítica (Ten20™, Weaver) para mejorar la conductancia entre la piel y el electrodo. Los electrodos de EEG se fijaron al cuero cabelludo con colodión (solución al 4%, Panreac, referencia 141278.0314), mientras que los electrodos de EOG y EMG se adhirieron a la piel de la cara con cinta quirúrgica extra-adhesiva (Fixomull®, BSN medical GmbH). Para acelerar el proceso de fijación y secado del colodión, se aplicó aire comprimido a cada electrodo colocado sobre el cuero cabelludo.

Las señales electrofisiológicas fueron amplificadas (BrainAmp MR, Brain Vision®), filtradas (filtro de paso de banda 0,1-100 Hz), digitalizadas (250 Hz, resolución 16-bits) y almacenadas para su posterior clasificación y análisis.

La clasificación de las diferentes fases del sueño se realizó manualmente a partir de épocas de EEG de 20 segundos (filtro paso de banda de 0,5-30 Hz) siguiendo criterios estandarizados (Rechtschaffen & Kales, 1968):

Vigilia relajada con ojos cerrados: Presencia de ritmo alfa continuo con máxima amplitud en regiones de la corteza parieto-occipital. Tono muscular relativamente alto y ausencia de movimientos oculares.

Fase 1: Transición entre la vigilia y el sueño ligero. Presencia intermitente de actividad alfa en menos del 50% de la época, junto con movimientos oculares lentos y una ligera reducción del tono muscular respecto al mostrado en vigilia.

Fase 2: Presencia de complejos K y/o de husos de sueño. Puede aparecer hasta un 20% de ondas lentas (ritmo delta, 0,5-3 Hz) en la época. Ausencia de actividad ocular y tono muscular reducido.

Fase 3: Presencia de ondas lentas (ritmo delta, 0,5-3 Hz) en más del 20% y menos del 50% de la época. Pueden también aparecer complejos K y/o husos de sueño de manera esporádica. Ausencia de actividad ocular y tono muscular reducido.

Fase 4: Presencia de ondas lentas (ritmo delta, 0,5-3 Hz) en más del 50% de la época. Las demás características son similares a las de la fase 3. La combinación de las fases 3 y 4 es lo que se conoce como sueño de ondas lentas (SOL).

Fase REM: Presencia de actividad EEG de baja amplitud y frecuencias entremezcladas (theta-alfa-beta) similar a la observada en el estado de vigilia activa con ojos abiertos. Este patrón de actividad cerebral se acompaña de movimientos oculares rápidos conjugados y atonía muscular.

El nivel de fragmentación del sueño se evaluó calculando la densidad de arousals en cada una de las fases del sueño (American Sleep Disorder Association, 1992). Un arousal se definió como un cambio abrupto en el EEG que incluye actividad alfa (7,5-12 Hz), theta (4-7 Hz) o

frecuencias superiores a 16 Hz. Para ello se empleó el índice de arousal (IA) equivalente a la ratio entre el número total de arousals en una fase del sueño y la duración total de esa fase del sueño (en horas).

3.4. Adquisición y post-procesamiento de las imágenes de RM cerebral

Las imágenes cerebrales se adquirieron en un escáner de RM Philips Achieva de 3 Teslas (Philips, The Netherlands) equipado con una bobina de cráneo de 8 canales. En cada participante, se adquirió una secuencia T1-3D de alta resolución con los siguientes parámetros: tiempo de repetición = 2300 ms, tiempo de eco = 4,5 ms, ángulo de rotación = 8°, dimensiones de la matriz de adquisición = 320 x 320, y resolución de vóxel = 0,8 mm isotrópico sin espacio entre cortes. El tiempo de adquisición de la secuencia fue de 9,1 min.

Cada imagen de RM cerebral se sometió a dos procedimientos de post-procesado diferentes, uno para estimar el espesor cortical mediante el programa Freesurfer v5.1 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) y otro para establecer el volumen de SG cerebral empleando el programa SPM12 (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm).

3.4.1. Estimación del espesor cortical

Inicialmente, a cada imagen de RM cerebral se le eliminó el cráneo y el tejido extracerebral (meninges, grasa) mediante la aplicación de una aproximación híbrida que combina algoritmos *watershed* y superficies deformables (Segonne *et al.*, 2004). Los algoritmos *watershed* son técnicas de morfología matemática que permiten, por una parte, establecer los límites de las regiones que integran una imagen compleja y, por otra, clasificar los vóxeles en función de los niveles de grises y la homogeneidad de sus texturas (Vincent & Soille, 1991). Las imperfecciones derivadas de este proceso fueron corregidas manualmente, corte a corte en los tres planos del cerebro, por técnicos con experiencia en este procedimiento.

Posteriormente, la imagen resultante fue editada manualmente para establecer una mejor delimitación entre la sustancia gris y blanca de la corteza cerebral. Después de esta corrección manual, se realizó la segmentación de la sustancia blanca que tras una posterior deformación y refinamiento, dio lugar a la superficie pial (Dale *et al.*, 1999). Esta superficie pial fue trasladada a una esfera para ajustarla a un modelo geométrico con parámetros conocidos (Fischl & Dale, 2001). A partir del modelo esférico de la corteza cerebral, se obtuvo el mapa de espesor cortical de cada participante que fue posteriormente registrado a la superficie esférica promedio de la muestra empleada en el presente estudio. Los mapas de espesor cortical fueron finalmente suavizados mediante wavelets esféricas (Bernal-Rusiel *et al.*, 2008). La **Figura 7** recoge de manera ilustrativa los diferentes pasos que integran este proceso.

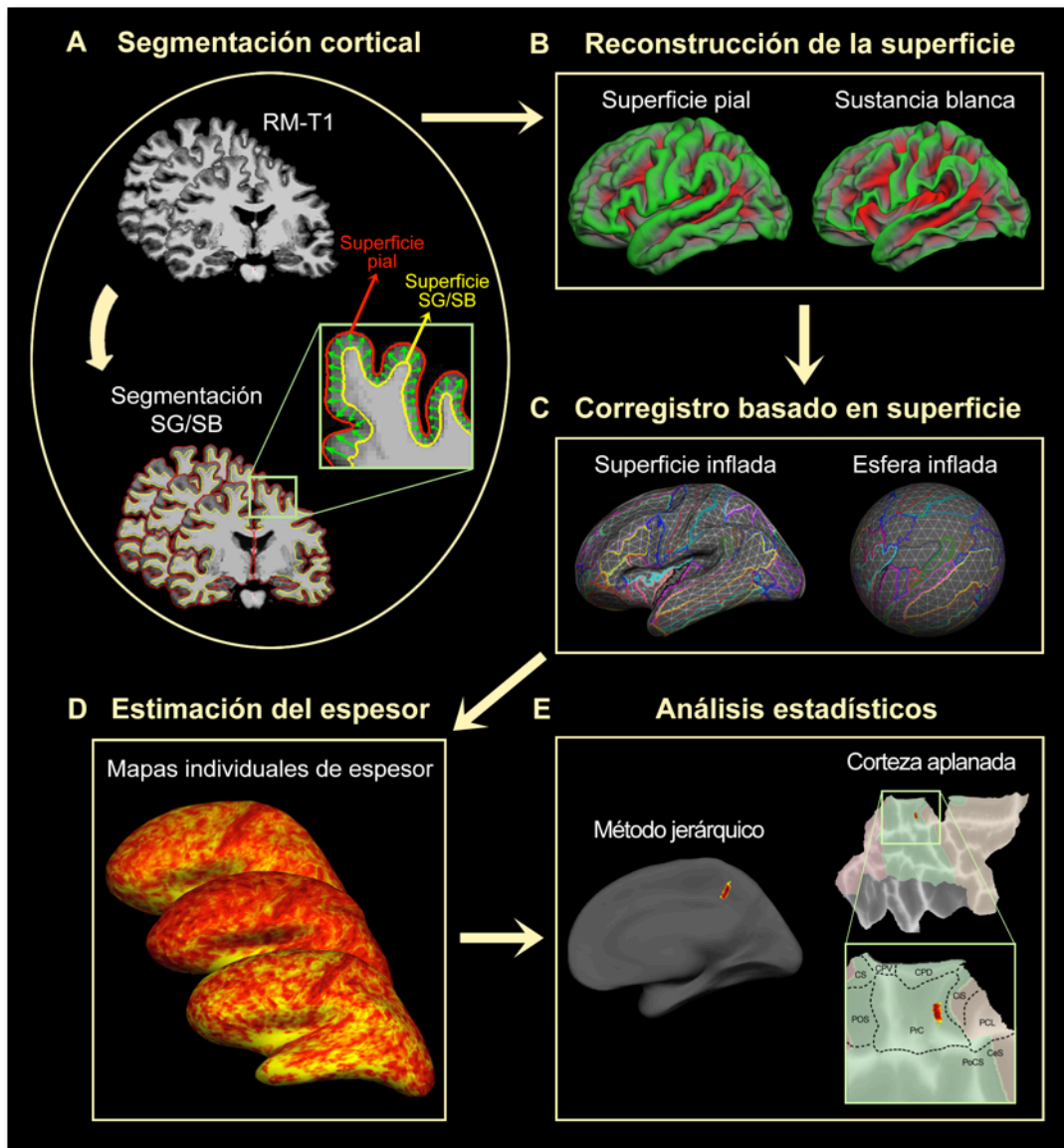


Figura 7. Diagrama esquemático de la metodología empleada para estimar los cambios de espesor cortical. **A.** A cada imagen de RM se le eliminó el cráneo (zona superior) y posteriormente se establecieron los límites entre la superficie pial y los compartimentos de sustancia gris (SG) y blanca (SB) cortical empleando procedimientos semi-automáticos (zona inferior). **B.** Obtención de la superficie pial (panel izquierdo) y de SB (panel derecho) en cada participante. **C.** La superficie cortical fue posteriormente inflada (panel izquierdo) y registrada a una esfera (panel derecho) con el objetivo de proyectarla sobre un sistema de coordenadas conocido. El etiquetado de las regiones corticales se realizó con un atlas que contenía 74 estructuras diferentes (37 para cada hemisferio) (Detryeux *et al.*, 2010). **D.** Estimación del mapa de espesor cortical en cada sujeto. El espesor cortical se definió como el promedio de la distancia mínima entre los vértices del límite de la cara interna de la SG y los vértices del límite de la superficie pial, calculados en ambas direcciones (Fischl & Dale, 2000). **E.** Para realizar los análisis estadísticos se empleó un modelo jerárquico (panel izquierdo) (Bernal-Rusiel *et al.*, 2010). Los cambios significativos fueron finalmente representados sobre superficies corticales aplanadas basadas en atlas citoarquitectónicos de las estructuras afectadas (panel derecho).

3.4.2. Estimación del volumen de sustancia gris cerebral

Primero se colocó manualmente el origen de coordenadas de cada imagen cerebral en la comisura anterior. A continuación, se segmentaron los diferentes compartimentos cerebrales (*i.e.*, LCE, SG y sustancia blanca) utilizando el procedimiento de segmentación automática implementado en el programa SPM12. Con el objetivo de minimizar las variaciones anatómicas entre los diferentes sujetos sin deformar excesivamente las imágenes cerebrales individuales, las imágenes segmentadas fueron registradas al cerebro promedio de la muestra mediante la aplicación del algoritmo DARTEL (*Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie Algebra*) (Ashburner, 2007). Finalmente, los mapas de SG cerebral fueron suavizados con kernels gaussianos isotrópicos de 12 mm. La **Figura 8** recoge de manera ilustrativa los pasos que componen este proceso. Todos los análisis fueron realizados en estaciones de trabajo Dell™ T7400, (procesadores Intel Xeon™ Dual Core 4, 3,2 GHz, 32 GB RAM) con MATLAB® v7.9 bajo Linux Centos4 X86-64 bits.

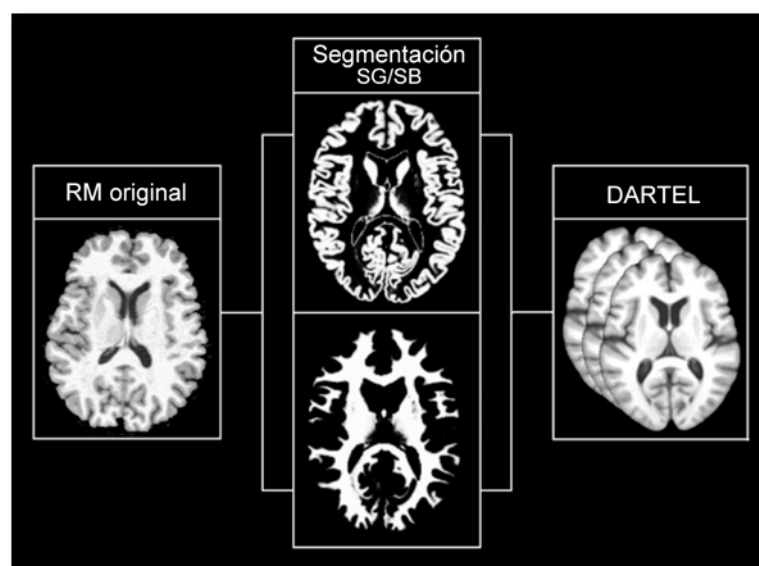


Figura 8. Diagrama esquemático del post-procesamiento de la imagen de RM para estimar los cambios de volumen de SG cerebral. **Panel izquierdo.** Imagen de RM cerebral tras la eliminación del cráneo con procedimientos automatizados. **Panel central.** Imagen de RM cerebral segmentada utilizando el procedimiento de segmentación automática implementado en el programa SPM12. Sustancia gris (SG) en el panel superior y sustancia blanca (SB) en el panel inferior. **Panel derecho.** Imágenes de RM cerebral tras la aplicación del algoritmo DARTEL, que tiende a minimizar las variaciones anatómicas entre los diferentes cerebros (Ashburner, 2007).

3.5. Análisis estadísticos

Las variables demográficas y cognitivas así como los parámetros derivados de los registros de PSG y de las determinaciones en sangre periférica se analizaron con el programa SPSS v.15 (SPSS Inc., Chicago, IL), utilizando un intervalo de confianza del 95% que corresponde a umbrales de $p < 0,05$. Tras corroborar el supuesto de normalidad para todas estas variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se aplicaron diferentes pruebas paramétricas.

Las diferencias de grupo en las variables demográficas y cognitivas se evaluaron mediante el estadístico t de Student para muestras independientes, con excepción de las diferencias de género que se evaluaron mediante la prueba chi-cuadrado. Para investigar si las variables de sueño (*i.e.*, latencia al comienzo del sueño, tiempo total de sueño, porcentaje de cada fase del sueño, IA de cada fase del sueño, tiempo de vigilia intra-sueño y eficiencia de sueño) y las diferentes determinaciones realizadas en sangre periférica diferían entre grupos, se utilizó un análisis de la covarianza (MANCOVA) que incluyó el diagnóstico (controles y DCL) como variable inter-sujetos, y la edad y el género como covariables.

Las diferencias de grupo en el volumen de SG cerebral se evaluaron mediante la aplicación del modelo lineal general implementado en el programa SPM12. Los falsos positivos se corrigieron aplicando la técnica de *Family Wise Error* (FWE).

Las diferencias de grupo en el espesor de la corteza se evaluaron mediante un modelo estadístico jerárquico (Bernal-Rusiel *et al.*, 2010). Este modelo controla inicialmente los falsos positivos a nivel de clúster mediante técnicas basadas en la teoría de campos aleatorios (*Random Field Theory*, FDR, siglas en inglés), para posteriormente controlar los falsos positivos a nivel de vértice dentro de cada clúster significativo mediante un procedimiento de FDR adaptativa. Esta aproximación ha mostrado una mayor sensibilidad y especificidad que otras técnicas estadísticas convencionales para detectar cambios de espesor cortical con una precisión submilimétrica, tanto en estudios de simulación como con datos reales procedentes de pacientes con EA. En este caso, el MANCOVA se aplicó para cada hemisferio cortical por separado.

Tras identificar el efecto del diagnóstico sobre las diferentes variables dependientes, evaluamos las posibles relaciones existentes entre los parámetros de sueño y el resto de variables estudiadas. En todos los casos, se aplicó un análisis de regresión lineal para estudiar la relación entre cada parámetro de sueño (variables independientes) y cada marcador periférico y de neuroimagen (variables dependientes) en cada grupo por separado, ajustado para la edad y el género. Al evaluar la relación entre los marcadores en sangre periférica (*i.e.*, A β , TAC y HCY) y los de neuroimagen (*i.e.*, espesor cortical y volumen de SG), los primeros actuaron como variable independiente y los segundos como variable dependiente. Si los coeficientes de regresión alcanzaban la significación en alguno de los grupos, se procedía a comparar dichos coeficientes entre ambos grupos. Cuando los marcadores de neuroimagen actuaron como variable dependiente, los falsos positivos se controlaron aplicando FDR en el caso del espesor cortical y FWE en el caso del volumen de SG cerebral.

Por último, se evaluó si alguna/s de las variables de sueño actuaba/n como posible/s mediador/es de la relación existente entre los diferentes marcadores periféricos y/o de neuroimagen. Para ello se utilizó un análisis de pautas (*path analysis*). Este análisis permite verificar la contribución directa de un conjunto de variables independientes sobre una variable dependiente, así como la interacción de estas variables independientes y su influencia indirecta sobre la variable dependiente (Aron & Aron, 2001). Un mediador (M) se considera como tal cuando su inclusión como variable intermediaria modifica significativamente la relación entre la variable independiente (X) y la variable dependiente (Y).

El modelo de mediación básico (MacKinnon *et al.*, 2007) aparece representado como un diagrama de pautas en la **Figura 9**. Particularmente, este modelo evalúa si los marcadores periféricos explican los cambios en los diferentes parámetros de sueño (pauta β_1), que a su vez se espera ejerzan un efecto sobre los marcadores de neuroimagen (pauta β_2). La pauta c' representa la relación entre los marcadores periféricos y los de neuroimagen tras controlar la influencia de los parámetros de sueño. Para considerar significativa la mediación de una variable se deben cumplir los siguientes criterios: i) que cada una de las pautas (β_1 y β_2) alcance la significación estadística, ii) que el producto de los coeficientes correspondientes a

ambas pautas ($\beta_1 \cdot \beta_2$), también conocido como efecto indirecto, sea significativamente diferente de cero (MacKinnon *et al.*, 2007), y iii) que el efecto total de los marcadores periféricos sobre los de neuroimagen (pauta c) sea también significativo. Las variables edad y género solo se incluyeron como covariables si contribuían a explicar una parte significativa de la varianza en el/los mediador/es y/o en la variable dependiente.

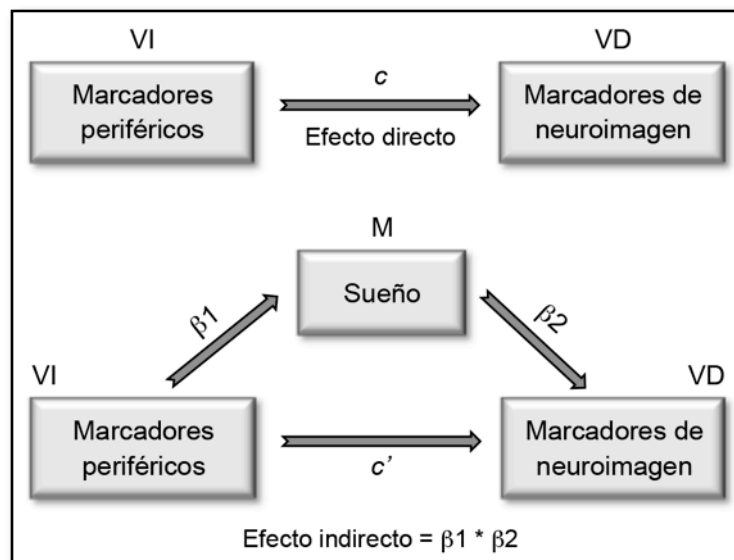


Figura 9. Modelo de mediación simple. Panel superior. Efecto directo (c) de los marcadores periféricos sobre los marcadores de neuroimagen. **Panel inferior.** Modelo de mediación simple que incluye los marcadores periféricos como variable independiente (VI), los marcadores de neuroimagen como variable dependiente (VD) y el sueño como mediador (M). Las flechas reflejan la dirección de la relación entre los diferentes elementos del modelo. El coeficiente de regresión β_1 refleja la relación entre los marcadores periféricos y los parámetros de sueño, mientras que el coeficiente β_2 refleja la relación entre el sueño y los marcadores de neuroimagen ajustada por el efecto de los marcadores periféricos. El coeficiente c' hace referencia a la relación entre la VI y la VD ajustada por el efecto del sueño. El efecto indirecto se calcula multiplicando los coeficientes β_1 y β_2 . Si cada una de estas pautas es significativa además del efecto indirecto, se concluye que el sueño ejerce un papel mediador sobre la relación existente entre la VI y la VD. Dicha mediación será completa si el coeficiente c' deja de ser significativo. La mediación será parcial si dicho coeficiente es menor que el efecto directo (c) pero continúa siendo significativo.

La significación estadística se determinó con el método de sesgo corregido y acelerado calculando intervalos de confianza mediante la técnica de *bootstrapping* (N = 1.000). La técnica de *bootstrapping* ha mostrado ser de utilidad en los análisis de mediación cuando el tamaño de la muestra es pequeño (Efron & Tibshirani, 1993), como ocurre en el presente estudio. Además, esta técnica posee mayor sensibilidad y precisión para estimar la magnitud del efecto indirecto que otros procedimientos similares, como el test de Sobel (Sobel, 1982) o la aproximación de pasos causales (Baron & Kenny, 1986).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Los resultados derivados del presente trabajo de Tesis han dado lugar a dos artículos, uno publicado en la revista *Neuroimage* (Anexo I; Sánchez-Espinosa *et al.*, 2014) y un segundo trabajo que se encuentra actualmente en proceso de revisión (Anexo II; Sánchez-Espinosa *et al.*, en revisión). Este apartado comienza con una descripción del perfil demográfico y cognitivo de la muestra analizada. A continuación se exponen las diferencias observadas al comparar los marcadores de sueño, en sangre periférica y de neuroimagen entre controles y pacientes con DCLa. Posteriormente, se muestran los resultados derivados de analizar la posible relación entre estos marcadores y si dichas asociaciones son capaces de distinguir a ambos grupos. Y por último, evaluamos si el sueño y el estado oxidativo podrían jugar un papel mediador en la relación existente entre la HCY y los marcadores de neuroimagen.

4.1. Perfil demográfico y cognitivo de la muestra

La **Tabla 1** incluye los descriptores demográficos y cognitivos de los controles y de los pacientes con DCLa. Ambos grupos fueron estadísticamente homogéneos en edad, género y años de educación. Tal como cabría esperar, las puntuaciones obtenidas en las diferentes pruebas cognitivas fueron significativamente más bajas en los pacientes con DCLa que en los controles. En concreto, los DCLa presentaron una mayor afectación de la función cognitiva global ($p = 0,01$) de acuerdo con las puntuaciones derivadas del MMSE, y un rendimiento más bajo en las pruebas de memoria inmediata ($p = 3*10^{-6}$) y demorada ($p = 5*10^{-9}$).

Tabla 1. Características demográficas y cognitivas de la muestra.

	Controles (n = 21)	DCLa (n = 21)	<i>p</i>
Edad	67 ± 5,5	69,8 ± 6,5	0,1
Género (M / H)	10 / 11	6 / 15	0,2
Años de escolarización	8,6 ± 4,3	8,2 ± 5,4	0,8
CDR	0	0,5	N/A
MMSE	28,3 ± 1,3	26,7 ± 2,5	0,01*
Memoria inmediata	14,2 ± 2,9	9,3 ± 2,8	10 ^{-6*}
Memoria demorada	13,3 ± 2,7	6,5 ± 4	10 ^{-9*}

Los resultados muestran la media ± desviación estándar. M / H = mujer / hombre. CDR (Escala de Demencia Clínica) = 0 (ausencia de demencia), CDR = 0,5 (demencia cuestionable). MMSE: Mini Examen Cognoscitivo.

4.2. Diferencias de grupo en la estructura del sueño

La **Tabla 2** muestra para cada grupo la media y desviación estándar de los parámetros relacionados con la *estructura del sueño* (*i.e.*, tiempo total de sueño, latencia al comienzo del sueño, porcentaje de cada fase del sueño, y eficiencia de sueño), *fragmentación del sueño* (porcentaje de vigilia intra-sueño e IA de cada fase del sueño) y *nivel subjetivo de somnolencia diurna* (puntuaciones obtenidas en la Escala de Somnolencia de Epworth, ESE).

Los pacientes con DCLa mostraron cambios significativos en la estructura del sueño. En comparación con los controles, los DCLa presentaron una reducción del porcentaje de fase REM ($p = 0,03$) y una mayor fragmentación del SOL, tal como se infiere del incremento de la densidad de arousals en este estado cerebral ($p = 10^{-5}$). Estas diferencias no se vieron acompañadas por un mayor nivel de somnolencia diurna ni por una peor eficiencia de sueño. De hecho, las puntuaciones en la ESE de todos los participantes siempre estuvieron por debajo del punto de corte (>10) a partir del cual se sospecha de la presencia de trastornos del sueño asociados con somnolencia diurna excesiva. Las variaciones en la somnolencia diurna y en la eficiencia de sueño tampoco guardaron relación alguna con la función cognitiva y/o con el resto de variables derivadas de la PSG.

Tabla 2. Parámetros de sueño.

	Controles (n=21)	DCLa (n=21)	<i>p</i>
Estructura del sueño			
TTS (min.)	395,7 ± 30,7	372,6 ± 55,5	0,2
Latencia de sueño (min.)	11,7 ± 7,4	15 ± 7,1	0,1
Fase 2 (%)	34,6 ± 6,9	36,3 ± 9,3	0,3
SOL (%)	23,6 ± 7	22,7 ± 12,2	0,8
REM (%)	14,1 ± 3,4	10,1 ± 4,6	0,03*
Eficiencia de sueño (%)	83,8 ± 6,1	78,6 ± 11,5	0,3
Fragmentación del sueño			
VIS (%)	13,2 ± 5,8	15,6 ± 6,2	0,5
IA Fase 2	0,31 ± 0,17	0,25 ± 0,13	0,1
IA SOL	0,05 ± 0,03	0,15 ± 0,08	10 ^{-5*}
IA REM	0,18 ± 0,14	0,22 ± 0,09	0,2
Somnolencia diurna			
ESE	5,2 ± 2,4	5,6 ± 3,5	0,6

Los resultados muestran la media ± desviación estándar. TTS: Tiempo Total de Sueño. SOL: Sueño de Ondas Lentas. REM: Rapid Eye Movements (fase REM). VIS (%): Porcentaje de Vigilia Intra-Sueño. IA: Índice de Arousal. ESE: Escala de Somnolencia de Epworth. *valores de *p* significativos en los análisis *post hoc*.

4.3. Diferencias de grupo en los marcadores en sangre periférica

La **Figura 10** muestra la media y el error estándar de la media para las concentraciones periféricas de A β , TAC y HCY en cada uno de los grupos evaluados. El MANCOVA mostró un efecto principal del grupo para los niveles de A β ($F_{3,36} = 4,41$; $p = 0,01$). Los análisis *post hoc* revelaron que los pacientes con DCLa presentaban concentraciones más elevadas de A β_{1-40} ($p = 0,006$) y A β_{1-42} ($p = 0,002$) que los controles, mientras que las diferencias observadas en la ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} al comparar controles ($0,23 \pm 0,38$) y DCLa ($0,12 \pm 0,05$) no alcanzaron la significación estadística ($p = 0,19$), debido probablemente a la excesiva variabilidad mostrada por el grupo control.

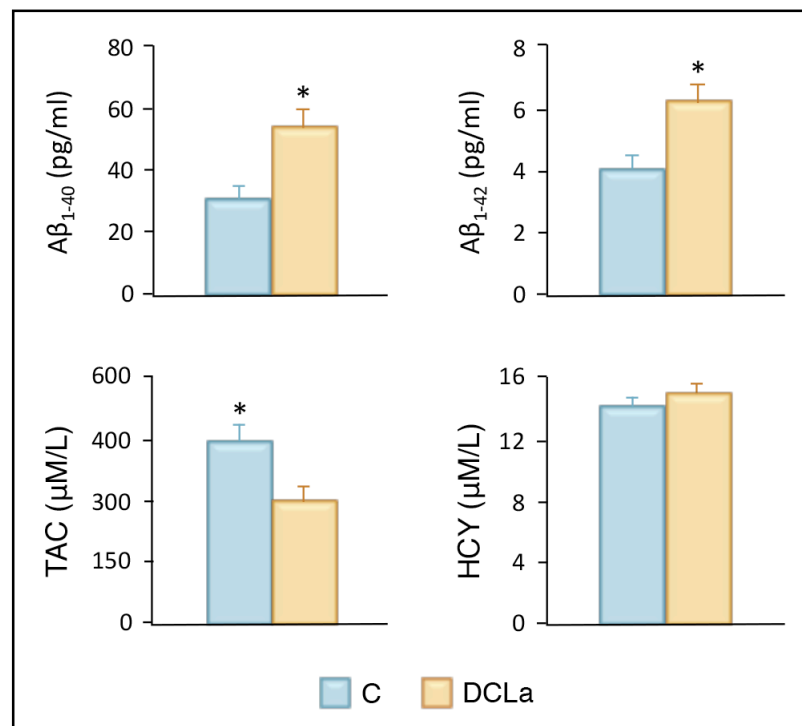


Figura 10. Diferencias de grupo en los marcadores en sangre periférica. Media y error estándar de la media para las determinaciones de Aβ, la capacidad antioxidante (TAC) y la homocisteína (HCY) en el grupo control y en los pacientes con DCLa. *indica que las diferencias de grupo fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los niveles de TAC también difirieron significativamente entre controles y DCLa ($p = 0,03$), siendo éstos más elevados en controles. Por el contrario, las concentraciones de HCY no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos, a pesar de que el porcentaje de sujetos que presentaron valores clínicos de HCY $> 14 \mu\text{M/L}$ fue prácticamente el doble en pacientes con DCLa (47,6%) que en controles (28,6%).

4.4. Diferencias de grupo en los marcadores de neuroimagen

El espesor cortical difirió significativamente al comparar los dos grupos (**Figura 11**). En concreto, los pacientes con DCLa mostraron una disminución de espesor cortical significativa en el precúneo del hemisferio derecho en comparación con los controles ($p_{FWE} < 0,0001$; tamaño del clúster = 191 mm^2).

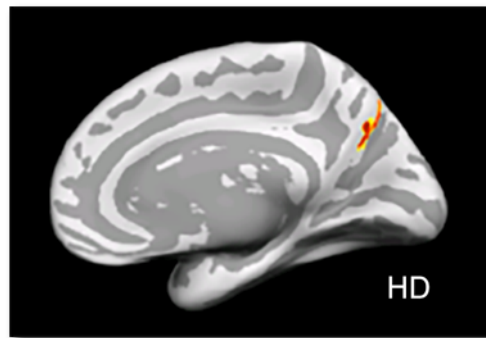


Figura 11. Diferencias de grupo en el espesor cortical. Mapa estadístico paramétrico que muestra la región donde los pacientes con DCLa mostraron una disminución de espesor cortical respecto a los controles.

En lo que respecta al volumen de SG cerebral, los pacientes con DCLa mostraron una reducción significativa del volumen del hipocampo derecho ($p_{FWE} = 0,002$; coordenadas MNI del vóxel significativo: [33 -11 -15]), giro temporal medio izquierdo ($p_{FWE} = 0,001$; coordenadas MNI: [-54 -36 5]) y giro frontal inferior derecho ($p_{FWE} = 0,001$; coordenadas MNI: [32 23 27]). La **Figura 12** ilustra estos resultados.

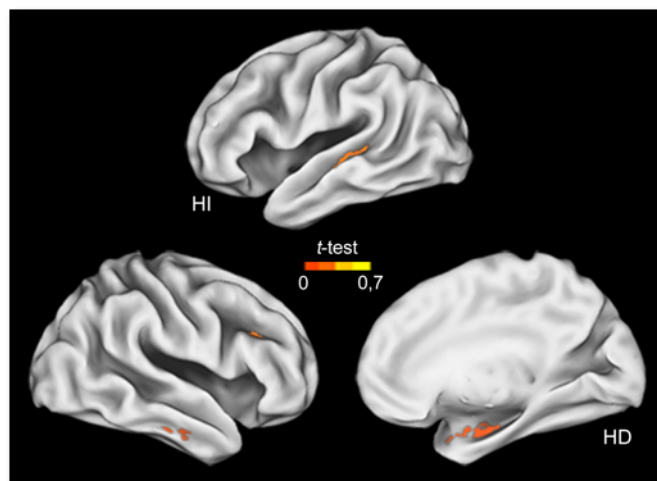


Figura 12. Diferencias de grupo en el volumen de SG cerebral. Mapas estadísticos paramétricos que muestran las regiones donde los pacientes con DCLa mostraron una reducción significativa del volumen de SG en comparación con los controles.

4.5. Relación entre los parámetros de sueño y los marcadores en sangre periférica

Los agregados de A β se han relacionado con alteraciones de la estructura del sueño en ratones transgénicos de EA (Roh *et al.*, 2012). Con el objetivo de evaluar si esta relación se extiende a humanos utilizando marcadores de A β en sangre periférica, estudiamos la relación entre las concentraciones de A β (A β_{1-40} , A β_{1-42} , y la ratio A β_{1-42} /A β_{1-40}) y los cambios observados en la estructura del sueño en los DCLa. Los análisis de regresión lineal mostraron una correlación positiva entre la densidad de arousals en el SOL y las concentraciones de A β_{1-42} en los pacientes con DCLa ($F_{3,20} = 3,8$; $p = 0,03$; $r = 0,57$; $p = 0,02$), una vez eliminados los posibles efectos de la edad y el género. Tal como se ilustra en la **Figura 13**, esta relación no llegó a ser significativa en el grupo control. De hecho, al comparar los coeficientes de regresión de ambos grupos se observó que la fuerza de la asociación entre los niveles de fragmentación del SOL y las concentraciones de A β_{1-42} fue significativamente mayor en los DCLa que en los controles ($Beta = -0,59$; $t = -2,1$; $p = 0,002$). Ningún otro marcador de A β estuvo relacionado con los cambios observados en el sueño, ni en controles ni en pacientes con DCLa.

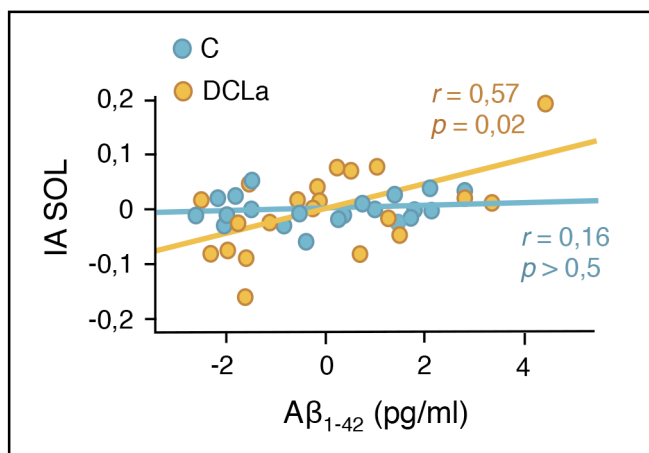


Figura 13. Relación entre la densidad de arousals en SOL y las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-42}$. Gráfico de dispersión que muestra las diferencias entre controles y pacientes con DCLa al comparar la relación entre el índice de arousals (IA) en SOL y las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-42}$. Nótese que esta relación solo fue significativa en el grupo con DCLa.

Además observamos que tanto la duración total de sueño ($R^2 = 0,5$; $F_{2,18} = 8,9$; $p = 0,002$) como la eficiencia de sueño ($R^2 = 0,4$; $F_{2,18} = 6,1$; $p = 0,01$) estaban relacionados con la TAC en los pacientes con DCLa. A pesar que esta relación no alcanzó la significación en el grupo control, no se detectaron diferencias significativas al comparar los coeficientes de regresión entre ambos grupos.

Por otra parte, se evaluó si las concentraciones periféricas de HCY estaban relacionadas con los cambios en los parámetros de sueño en cada grupo. Los resultados mostraron que cuanto más elevadas eran las concentraciones de HCY menor era la duración del sueño ($R^2 = 0,56$; $F_{2,18} = 11,3$; $p = 0,001$) y la eficiencia de sueño ($R^2 = 0,5$; $F_{2,18} = 7,4$; $p = 0,005$) en los pacientes con DCLa. Como ocurriera con la TAC, no se apreciaron diferencias significativas al comparar los coeficientes de regresión arrojados por los dos grupos, aún cuando dicha relación no alcanzó la significación estadística en el grupo control.

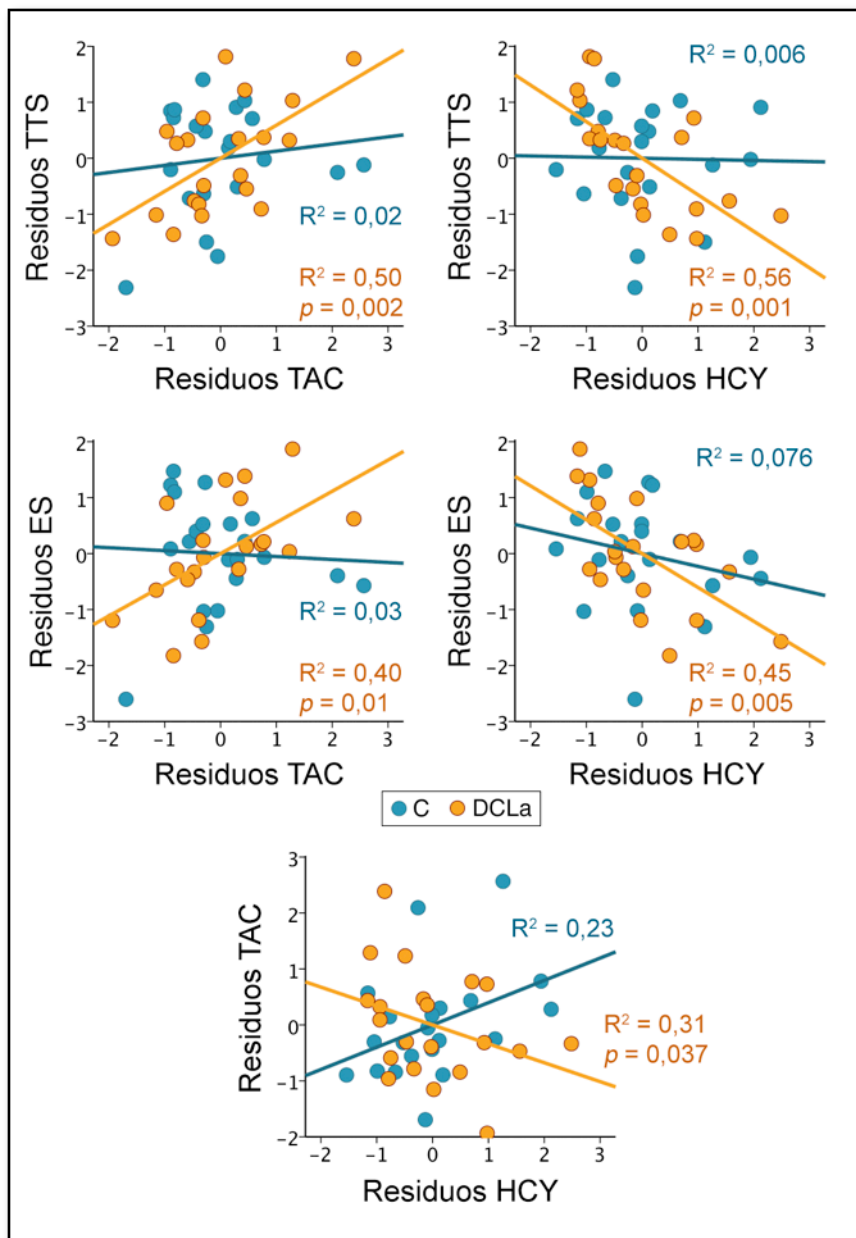


Figura 14. Relación entre parámetros de sueño, concentraciones de HCY y TAC. Los gráficos de dispersión muestran la relación existente entre los residuos de los parámetros de sueño (tiempo total del sueño y eficiencia de sueño) y los residuos de los niveles de HCY y TAC tras eliminar los efectos de la edad y el género en cada grupo. La relación entre las concentraciones de HCY y TAC se muestra en el panel inferior. Nótese que ninguna de las relaciones presentadas alcanzó la significación estadística en el grupo control. En cada gráfica aparece el coeficiente de regresión (R^2) y el valor de probabilidad (valor de p) para cada grupo.

Los niveles de HCY también estuvieron estrechamente relacionados con la TAC en los pacientes con DCLa ($R^2 = 0,31$; $F_{2,18} = 4,0$; $p = 0,037$). En esta ocasión, sí se encontraron diferencias significativas al comparar los coeficientes de regresión entre ambos grupos ($F_{2,18} = 4,5$; $p = 0,005$; $Beta = -1,1$; $t = -2,3$; $p = 0,026$). La **Figura 14** muestra los gráficos de dispersión con las diferentes relaciones encontradas entre los parámetros de sueño y los niveles de HCY y la TAC en cada grupo.

4.6. Relación entre los cambios en la estructura del sueño y los marcadores de neuroimagen

A continuación se evaluaron si las alteraciones del sueño mostradas por los pacientes con DCLa estaban asociadas a patrones regionales de disminución de espesor cortical. Los análisis de regresión mostraron una relación significativa entre la disminución del sueño REM en los DCLa y la reducción de espesor en la corteza cingulada posterior ($p_{FWE} = 3*10^{-5}$) y en el precúneo del hemisferio izquierdo ($p_{FWE} = 4*10^{-4}$), así como en el giro postcentral a nivel bilateral (izquierdo: $p_{FWE} = 2*10^{-4}$; derecho: $p_{FWE} = 9*10^{-7}$). Dichas relaciones no se observaron en el grupo control. La información sobre los resultados de este contraste está contenida en la **Tabla 3**. La **Figura 15** muestra las regiones corticales en las que el espesor correlacionó con la disminución de sueño REM en los pacientes con DCLa.

Tabla 3. Correlaciones entre el porcentaje de sueño REM y el espesor cortical en pacientes con DCLa.

Región cortical	TC (mm ²)	<i>t</i>	<i>r</i>	p_{FWE}
Giro postcentral derecho (BA3)	420	4,3	0,56	$9*10^{-7}$
Giro postcentral izquierdo (BA3)	176	3,7	0,56	$2*10^{-4}$
Precúneo izquierdo (BA7)	133	4,1	0,54	$4*10^{-4}$
Cingulado posterior izquierdo (BA23)	76	5	0,60	$3*10^{-5}$

BA: área de Brodmann; TC: tamaño de clúster en mm²; *t*: valor del estadístico *t* para cada clúster; *r*: coeficiente de Pearson; p_{FWE} : valor de *p* corregida para cada clúster.

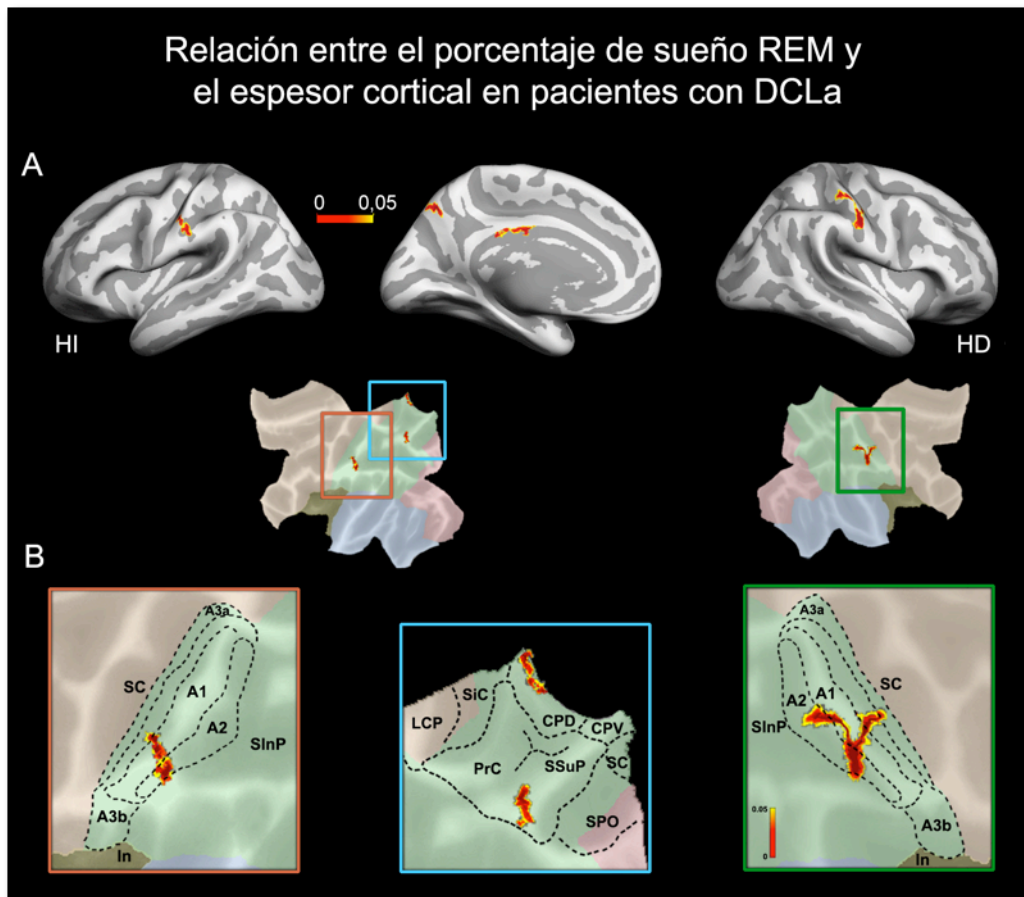


Figura 15. Relación entre el porcentaje de sueño REM y los cambios de espesor cortical en pacientes con DCLa. **A.** Mapas estadísticos paramétricos que muestran las regiones donde la disminución de espesor cortical correlacionó con la disminución del porcentaje de sueño REM en los pacientes con DCLa ($p_{FWE} < 0,05$; clúster > 90 vértices). HD: hemisferio derecho. HI: hemisferio izquierdo. **B.** Localización de los clústers significativos sobre superficies corticales aplanadas derivadas de mapas citoarquitectónicos de las regiones afectadas. *Abreviaturas de la corteza somatosensorial primaria* (Greyer *et al.*, 1999): A1, A2, A3a, A3b: Área 1, Área 2, Área 3a, Área 3b de la corteza somatosensorial primaria; SC: surco central; SInP: surco intraparietal; In: ínsula. *Abreviaturas del lóbulo parietal superior* (Scheperjans *et al.*, 2008): LCP: lóbulo paracentral posterior; SiC: surco del cíngulo; PrC: precúneo; CPD: cíngulo postdorsal; CPV: cíngulo postventral; SSuP: surco subparietal; SC: surco central; SPO: surco parieto-occipital.

Las correlaciones mencionadas anteriormente desaparecieron en gran medida tras introducir los niveles de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ en el modelo lineal general. Para determinar si este resultado fue producto de una disminución en la potencia estadística, se restringieron los análisis a las regiones en las que el sueño REM mostró correlaciones significativas con el espesor cortical. La mayoría de las correlaciones sobrevivieron a este análisis, excepto para los realizados en el precúneo. Las áreas en las que se observaron correlaciones significativas fueron más reducidas, 27 mm² en el cíngulo posterior y giro postcentral izquierdo tras incluir las concentraciones de $A\beta_{1-40}$ como covariable ($r = 0,68$; $p = 5 \cdot 10^{-5}$), 54 mm² en el cíngulo posterior izquierdo ($r = 0,67$; $p = 8 \cdot 10^{-5}$) y 85 mm² en el caso del giro postcentral izquierdo tras incluir las concentraciones de $A\beta_{1-42}$ como covariable ($r = 0,48$; $p = 0,002$). Parece, por tanto, que las concentraciones plasmáticas de $A\beta$ explicaron en gran medida la relación existente entre el sueño REM y la pérdida de espesor cortical en el precúneo de los pacientes con DCLa, mientras que su contribución a las diferencias encontradas en el caso del cíngulo posterior y giro postcentral izquierdo fue escasa. No se observó una relación significativa entre la densidad de arousals en SOL y el espesor cortical ni en controles ni en pacientes con DCLa. Este hecho fue independiente de que los niveles plasmáticos de $A\beta$ se incluyeran o no como covariable en el modelo estadístico. Así como tampoco se encontraron relaciones entre los parámetros de sueño y el volumen de SG cerebral.

4.7. Relación entre los marcadores en sangre periférica y los marcadores de neuroimagen

En un siguiente paso, investigamos si los cambios en las concentraciones plasmáticas de $A\beta$ correlacionaban con variaciones en el espesor de la corteza en cada grupo. Estos análisis mostraron que los niveles de $A\beta$ no estaban relacionados con los cambios de espesor cortical en los controles. Sin embargo, el incremento de las concentraciones de $A\beta_{1-40}$ correlacionó con la disminución de espesor cortical del cíngulo posterior a nivel bilateral (izquierdo: $p_{FWE} = 10^{-5}$; derecho: $p_{FWE} = 4 \cdot 10^{-5}$) en los pacientes con DCLa. Estos resultados, ilustrados en la **Figura 16**, se mantuvieron tras incluir como covariable el IA en SOL (izquierdo: $p_{FWE} = 6 \cdot 10^{-5}$;

derecho: $p_{FWE} = 9 \cdot 10^{-5}$) pero desaparecieron al incluir el sueño REM como covariable. En principio, este resultado es el que cabría esperar en función de los hallazgos comentados en el apartado anterior, dado que tanto los niveles de $A\beta_{1-40}$ como el porcentaje de sueño REM correlacionaron con la pérdida de espesor cortical en el cíngulo posterior izquierdo. Sin embargo, en la **Figura 15** puede observarse que las áreas afectadas dentro de dicha región fueron ligeramente diferentes en cada caso. La correlación con el sueño REM fue más evidente en BA23 (**Tabla 3**), mientras que la correlación con los niveles de $A\beta_{1-40}$ lo fue en BA31 (**Tabla 4**). Cuando los análisis de regresión se limitaron a estas regiones en particular, y se incluyó como covariable el porcentaje de sueño REM o las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-40}$, la correlación continuó siendo significativa, aunque los resultados se restringieron a regiones más pequeñas (REM como covariable: 41 mm^2 ; $R = 0,55$; $p_{FWE} = 5 \cdot 10^{-3}$; $A\beta_{1-40}$ como covariable: 27 mm^2 ; $R = 0,68$; $p_{FWE} = 5 \cdot 10^{-6}$).

Por otra parte, los análisis de regresión revelaron una correlación significativa entre el incremento de las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-42}$ y la disminución de espesor de la corteza entorrinal derecha ($p_{FWE} = 3 \cdot 10^{-5}$) en pacientes con DCLa (**Figura 16**). Esta relación se mantuvo intacta tras introducir en el modelo el IA en SOL como covariable, pero desapareció cuando se introdujo el sueño REM como covariable. Este último resultado fue inesperado dada la ausencia de relación entre el porcentaje de sueño REM y las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-42}$, o entre el sueño REM y el espesor de la corteza entorrinal derecha. Para entender mejor este resultado se repitió el mismo análisis restringiéndolo a esta región. Estos análisis volvieron a confirmar la ausencia de relación entre las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-42}$ y la disminución de espesor cortical cuando el sueño REM se incluyó como covariable, por lo que la duración del sueño REM parece ser un moderador de esta relación. La **Tabla 4** incluye información sobre los resultados de los análisis de regresión entre las concentraciones plasmáticas de $A\beta$ y el espesor cortical.

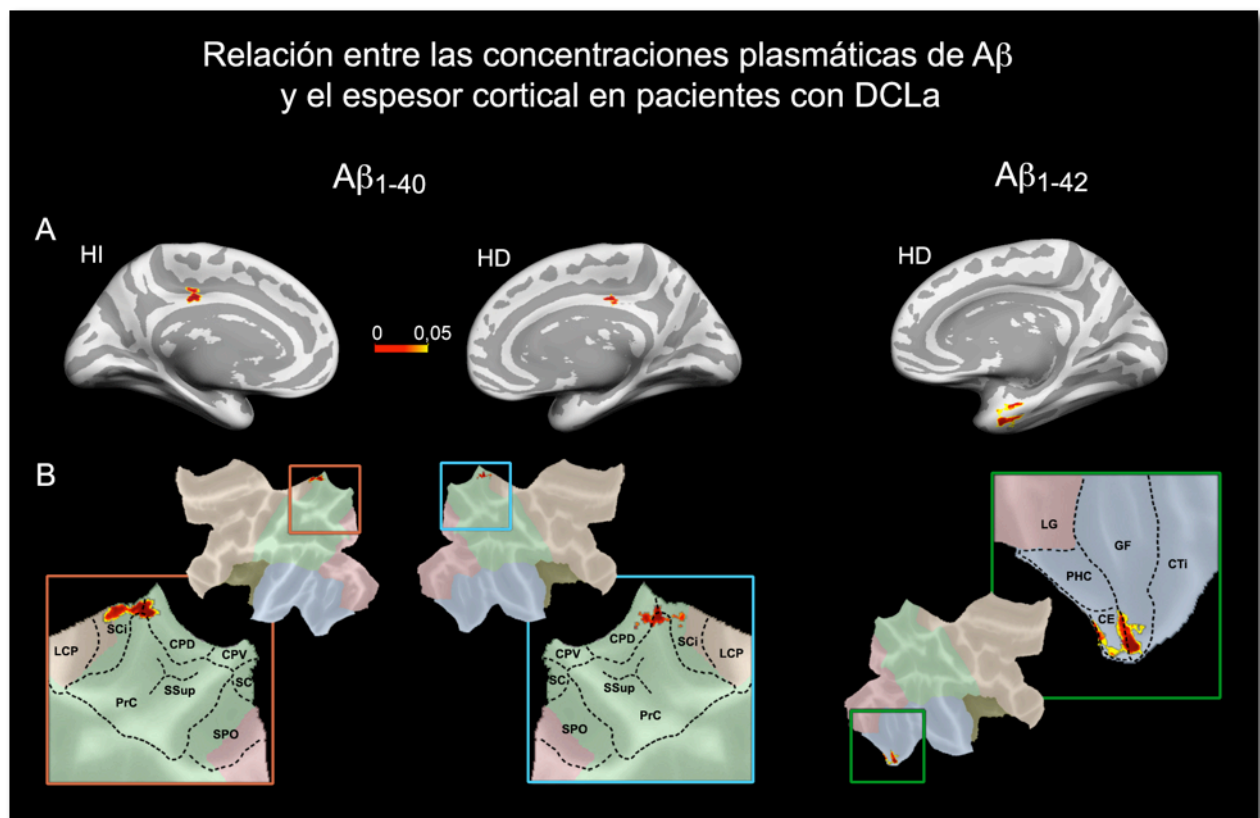


Figura 16. Relación entre las concentraciones plasmáticas de A β y los cambios de espesor cortical en pacientes con DCLa. **A.** Mapas estadísticos paramétricos que muestran las regiones donde las relaciones existentes entre el aumento de A β_{1-40} o A β_{1-42} y la pérdida de espesor cortical fueron significativas en los DCLa ($p_{FWE} < 0,05$; clúster > 90 vértices). HI: hemisferio izquierdo. HD: hemisferio derecho. **B.** Localización de los clústers significativos en superficies corticales aplanadas derivadas de mapas citoarquitectónicos humanos de las regiones afectadas. *Abreviaturas para el lóbulo parietal superior* (Scheperjans *et al.*, 2008): LCP: lóbulo paracentral posterior; SCi: surco del cíngulo; PrC: precúneo; CPD: cíngulo postdorsal; CPV: cíngulo postventral; SSup: surco subparietal; SC: surco central; SPO: surco parietooccipital. *Abreviaturas para la corteza entorrinal* (McDonald *et al.*, 2000): CE: corteza entorrinal; CPH: corteza parahipocampal; GF: giro fusiforme; CTi: corteza temporal inferior; GL: giro lingual.

Tabla 4. Correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de A β y los cambios de espesor cortical en pacientes con DCLa.

Región cortical	TC (mm ²)	<i>t</i>	<i>r</i>	<i>p</i> _{FWE}
Aβ₁₋₄₀				
Cingulado posterior izquierdo (BA31)	144	5,5	0,66	10 ⁻⁵
Cingulado posterior derecho (BA31)	58	4,9	0,61	4*10 ⁻⁵
Aβ₁₋₄₂				
Corteza entorrinal derecha (BA28)	282	5,0	0,62	3*10 ⁻⁵

BA: área de Brodmann; TC: tamaño del clúster en mm²; *t*: valor del estadístico *t* para cada clúster; *r*: coeficiente de Pearson; *p*_{FWE}: valor de *p* corregida para cada clúster.

Por último, se investigó si los niveles de TAC y HCY estaban relacionados con los cambios de volumen de la SG cerebral. Los análisis de regresión revelaron una correlación positiva entre los niveles de TAC y el volumen del lóbulo temporal medio izquierdo en los pacientes con DCLa (*p*_{FWE} = 0,002; coordenadas MNI del vóxel más representativo: [-60 -57 9]). Estos resultados se ilustran en la **Figura 17A**. La disminución de volumen en esta región se asoció además con el aumento de los niveles de HCY en los DCLa (*p*_{FWE} = 0,014; coordenadas MNI: [-53 -54 6]), pero no en los controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar los coeficientes de regresión entre ambos grupos. Las gráficas de dispersión para ambos análisis se muestran en la **Figura 17** (paneles **B** y **C**).

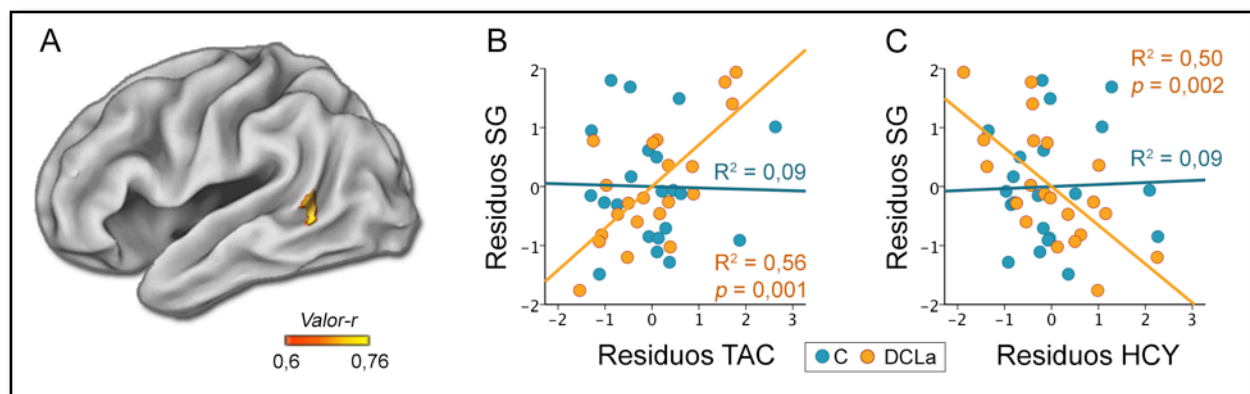


Figura 17. Relación entre las concentraciones de HCY y la TAC con el volumen de SG cerebral. A. Mapa estadístico paramétrico que muestra la región donde hubo correlaciones positivas entre las concentraciones de TAC/HCY y el volumen de sustancia gris (SG) ($p_{FWE} < 0,05$) en el grupo con DCLa. A la derecha se muestran los gráficos de dispersión que muestran la relación entre los residuos de la TAC (B) y las concentraciones de HCY (C) con los residuos de la SG. En ambos casos se incluyen los coeficientes de regresión (R^2) y el valor de probabilidad (valor de p) para cada grupo.

4.8. Papel mediador del sueño

Una vez caracterizada la relación entre HCY, TAC y sueño en los DCLa, se evaluó si el sueño podría actuar como mediador de la relación HCY-TAC. Los efectos conjuntos e indirectos derivados de los modelos de mediación simple señalaron que esta relación ocurría exclusivamente en los pacientes con DCLa. Más específicamente, observamos que el incremento de los niveles de HCY en el grupo con DCLa, pero no en el grupo control, se acompañó de una disminución de la duración total del sueño y de la eficiencia de sueño, lo que a su vez conllevó una disminución de la TAC (**Figura 18, paneles A-B**). Muy al contrario, la HCY no jugó ningún papel mediador sobre la relación existente entre el sueño y la TAC, como tampoco la TAC medió la relación existente entre la HCY y el sueño.

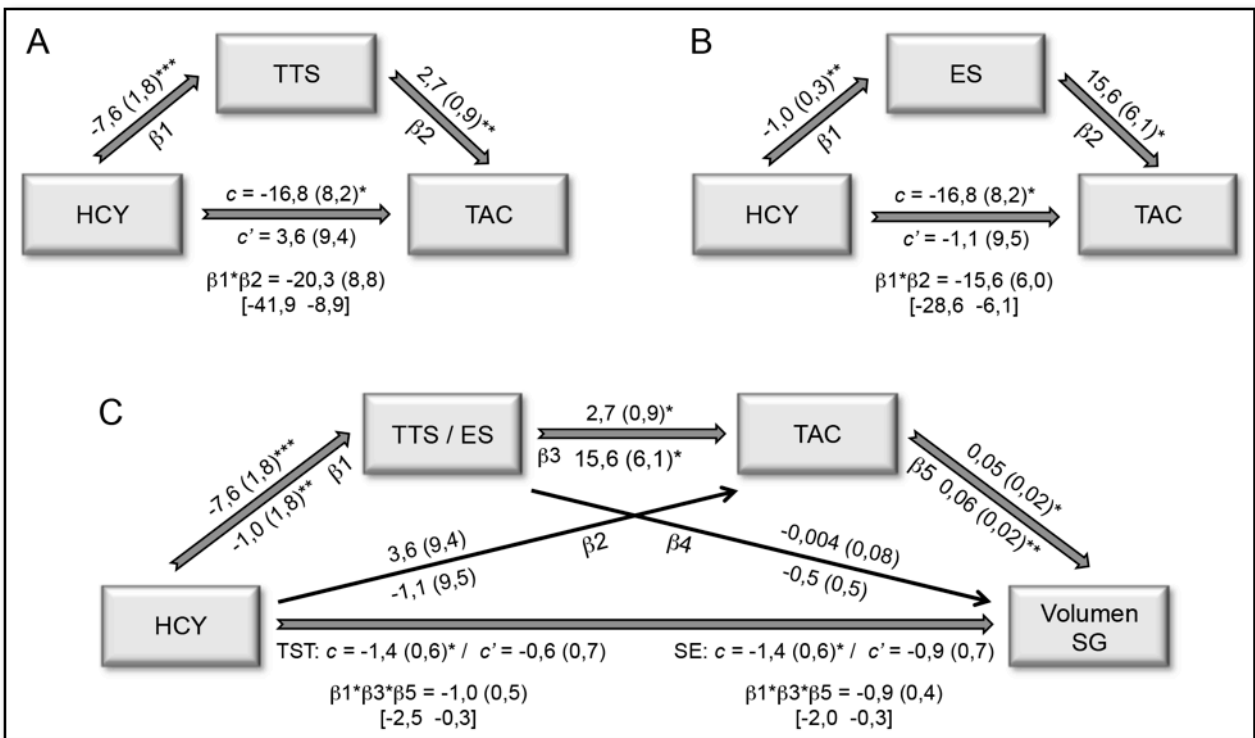


Figura 18. Efectos de mediación simple y múltiple. Coeficientes de regresión no estandarizados (error estándar) para la relación entre HCY y TAC mediada por el tiempo total de sueño (**A**) o por la eficiencia de sueño (**B**) en los pacientes con DCLa. **C.** Coeficientes de regresión no estandarizados (error estándar) para la relación entre HCY y la disminución de sustancia gris (SG) mediada por la relación serial entre el tiempo total de sueño/eficiencia del sueño y la TAC en los pacientes con DCLa. Nótese que para cada modelo también se incluyen los efectos directos totales (*c*), los mismos efectos tras controlar la influencia del tiempo total de sueño o de la eficiencia de sueño y de la TAC (*c'*), y los coeficientes de regresión estandarizados para lo efectos indirectos de dos pautas ($\beta_1*\beta_2$) y tres pautas ($\beta_1*\beta_3*\beta_5$) junto con el 95% de intervalo de confianza. Los coeficientes mostrados en la parte superior de cada flecha se refieren al tiempo total de sueño (TTS) como mediador, mientras que los coeficientes mostrados en la parte inferior hacen referencia a la eficiencia de sueño (ES) como variable mediadora. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Dado que los resultados confirmaron que tanto el incremento de HCY como la disminución de la TAC estaban relacionados con una disminución de volumen del lóbulo temporal medial izquierdo en los pacientes con DCLa, se decidió evaluar el efecto de mediación serial que se muestra en la **Figura 18C**. Los resultados obtenidos a partir de este modelo mostraron que tanto los efectos relacionados con cada una de las pautas como el efecto indirecto triple fueron significativos tanto para el tiempo total de sueño como para la eficiencia de sueño en los DCLa. Esta compleja relación serial sugiere que el incremento de los niveles de HCY contribuye a reducir el tiempo total de sueño y la eficiencia de sueño, lo que a su vez podría provocar una disminución de la TAC que, en última instancia, podría desembocar en un daño neuronal reflejado en la disminución de volumen de SG en los pacientes con DCLa. El efecto de mediación dejó de ser significativo cuando se invirtió la dirección de la relación de causalidad dentro del modelo (HCY → TAC → sueño → volumen de SG) o cuando se intercambió la variable dependiente por la independiente (volumen de SG → sueño → TAC → HCY).

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las alteraciones de los ritmos circadianos en general y del sueño en particular afectan a una amplia variedad de procesos moleculares, celulares y fisiológicos que facilitan la aparición de trastornos neurológicos y psiquiátricos en las últimas etapas de la vida (Steiger *et al.*, 2013; Clark & Vissel, 2014; Landgraf *et al.*, 2014; Lucey & Bateman, 2014; Shan *et al.*, 2015; Hurtado-Alvarado *et al.*, 2016). Dada la modulación circadiana de la expresión del A β cerebral (Bateman *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012) y la elevada prevalencia de los trastornos del sueño en la EA (Loewenstein *et al.*, 1982; Prinz *et al.*, 1982; Vitiello *et al.*, 1990; Petit *et al.*, 1993; Moe *et al.*, 1995; Vitiello & Borson, 2001; Bombois *et al.*, 2010), se ha barajado la idea de que dichas alteraciones pudieran exacerbar la patología subyacente y facilitar así la progresión de la EA (Gerstner *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2014; Lucey & Bateman, 2014).

Esta hipótesis viene avalada por estudios que sugieren por un lado, que la privación de sueño en modelos animales dificulta la eliminación (Xie *et al.*, 2013) y el metabolismo del A β cerebral (Roh *et al.*, 2012; Ooms *et al.*, 2014; Tabuchi *et al.*, 2015), además de incrementar los niveles de estrés oxidativo (D'Almeida *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Mathangi *et al.*, 2012; Villafuerte *et al.*, 2015) y, por otro, que las relaciones entre las alteraciones del sueño y la agregación del A β cerebral son recíprocas (Ju *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015; Musiek *et al.*, 2015; Roh *et al.*, 2015). Todo ello no hace sino fortalecer un círculo vicioso que se traduce en mayores concentraciones de A β cerebral, con el consiguiente daño sináptico y muerte neuronal. Los hallazgos del presente estudio fueron consistentes con esta idea, al mostrar en pacientes con DCLa que la fragmentación del SOL se acompaña de un incremento en las concentraciones plasmáticas de A β_{1-42} que a su vez correlaciona con una reducción del espesor de la corteza entorrinal (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2014; Anexo I), región afectada en la EA desde estadios muy tempranos (Gómez-Isla *et al.*, 1996).

Por otra parte, el presente trabajo reveló que la disminución del sueño REM en los pacientes con DCLa está relacionada con una reducción de espesor cortical en otras regiones igualmente afectadas por la progresión de la EA, como el cíngulo posterior (Sánchez-Espinosa *et al.*,

2014; Anexo I), mientras que aspectos más relacionados con la calidad del sueño, como su duración y eficiencia, actúan como mediadores de la relación existente entre la HCY y la TAC (Sánchez-Espinosa *et al.*, en revisión; Anexo II). En conjunto, estos resultados sugieren que las características del sueño de los pacientes con DCLa podrían afectar a la integridad cerebral por diferentes vías, algunas más directas y otras más indirectas, modulando la influencia que ejercen otros factores relacionados con la patofisiología de la enfermedad.

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que ha relacionado patrones objetivos de sueño con niveles de HCY y TAC en el contexto de la EA. Estudios previos han mostrado que los pacientes con DCL/EA presentan niveles elevados de HCY y una disminución de la TAC (Guidi *et al.*, 2006), y que tanto el incremento de los niveles de HCY (Ho *et al.*, 2001; Jara-Prado *et al.*, 2003; Streck *et al.*, 2003; Koz *et al.*, 2010) como la privación de sueño en modelos animales (D'Almeida *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Mathangi *et al.*, 2012; Villafuerte *et al.*, 2015) agravan el daño oxidativo cerebral. Los resultados del presente trabajo supusieron un paso adicional al mostrar que la disminución de la calidad de sueño en pacientes con DCLa, manifestada en una reducción de la duración y la eficiencia del mismo, en combinación con el descenso de las defensas antioxidantes, actúan como mediadores secuenciales de la relación existente entre la HCY y la disminución del volumen de SG de regiones en el lóbulo temporal. Un aspecto a resaltar, por su aplicación en fases asintomáticas, es que estas relaciones aparecieron aún cuando los pacientes no presentaron de media valores clínicos de HCY ni alteraciones significativas en la calidad del sueño con respecto a los controles (Sánchez-Espinosa *et al.*, en revisión; Anexo II).

De confirmarse estos hallazgos con muestras más amplias, se debería evaluar si las intervenciones dirigidas a mejorar la calidad del sueño y/o a reducir los niveles de HCY y el daño oxidativo son capaces de modificar las trayectorias patológicas de envejecimiento en personas mayores asintomáticas en riesgo de desarrollar EA. Dada la naturaleza modificable de estos factores, esta estrategia podría disminuir sensiblemente la prevalencia de la EA, con el consiguiente impacto sobre la calidad de vida de las personas mayores y la reducción del gasto socio-sanitario dedicado a esta condición neurodegenerativa.

5.1. Los pacientes con DCLa presentan niveles elevados de A β plasmático

Los resultados derivados del presente estudio mostraron que las concentraciones plasmáticas de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ están elevadas en los pacientes con DCLa, aspecto que ya había sido observado en otros estudios al compararlos con los controles (Assini *et al.*, 2004; Sobów *et al.*, 2005) y con los enfermos de Alzheimer (Mheta *et al.*, 2000; Sobów *et al.*, 2005). De hecho, los pacientes con EA familiar (Scheuner *et al.*, 1996; Ringman *et al.*, 2008), los individuos que tienen familiares directos con EA esporádica (Ertekin-Taner *et al.*, 2008) e incluso los pacientes con síndrome de Down (Schupf *et al.*, 2007) también presentan concentraciones elevadas de A β ₁₋₄₂ en plasma que, sin embargo, disminuyen conforme la enfermedad progresa. Aun así, los resultados no siempre son consistentes (Tamakoa *et al.*, 1996; Vanderstichele *et al.*, 2000; Fukumoto *et al.*, 2003; Pesaresi *et al.*, 2006; Lui *et al.*, 2010), lo cual podría deberse a la influencia de determinados factores endógenos y ambientales sobre el metabolismo del A β (Blasko *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009). En cualquiera de los casos, evidencias muy diversas apuntan a que existe una relación entre los niveles circulantes de A β y la EA.

La mayoría de las propuestas realizadas hasta la fecha sugieren que la acumulación cerebral de A β es probablemente la manifestación patológica más incipiente de la EA (Jack *et al.*, 2010; Sperling *et al.*, 2013; Dubois *et al.*, 2014). Esto ha impulsado la realización de estudios para determinar cómo progresa la acumulación del A β cerebral desde las fases preclínicas y cómo dicha evolución se relaciona con otros biomarcadores de la enfermedad. Los resultados derivados de estudios *post mortem* indican que en las fases prodrómicas, los agregados de A β están presentes en estructuras del lóbulo temporal medial que son claves para la memoria, como la corteza entorrinal (Mufson *et al.*, 1999), el hipocampo y la amígdala (Haroutunian *et al.*, 1998). Los estudios *in vivo* realizados con PET de A β confirman estos resultados, mostrando una mayor carga de A β en regiones de la corteza temporal y del cíngulo posterior, sobre todo en los DCL que progresan a EA (Koivunen *et al.*, 2011). Un hecho evidente, tanto en las fases preclínicas como prodrómica, es que el daño neuronal que sufren estas estructuras cerebrales (Whitwell *et al.*, 2013) y su impacto sobre la cognición (Tateno *et al.*, 2015) viene determinado

por la presencia de niveles clínicos de A β cerebral. No es de extrañar, por tanto, que la tasa anual de cambio en la carga de A β cerebral sea un excelente predictor de la progresión a EA en pacientes con DCL (Hatashita & Wakebe, 2017).

Aunque los marcadores de amiloidosis basados en neuroimagen, LCE y plasma podrían mostrar un curso temporal diferente (Palmqvist *et al.*, 2016), las evidencias indican que los resultados derivados del PET de A β están relacionados con los obtenidos a partir del LCE y del plasma. En concreto, se ha observado que cuanto mayor es la carga de A β cerebral en PET menores son las concentraciones de A β en LCE (Forsberg *et al.*, 2008; 2010; Zwan *et al.*, 2014; 2015), dos medidas que correlacionan con el deterioro de la memoria episódica tanto en pacientes con DCL (Forsberg *et al.*, 2008; 2010) como en individuos asintomáticos (Pike *et al.*, 2007; Darby *et al.*, 2011; Doré *et al.*, 2013). Sin embargo, el aspecto más relevante para nuestro estudio es la relación encontrada entre los marcadores plasmáticos de A β y la carga de A β cerebral manifestada por la retención de PET-PiB (Park *et al.*, 2017). En este punto, merece la pena resaltar que si bien las concentraciones plasmáticas de A β en la línea base no son capaces de predecir la progresión de la enfermedad, el incremento progresivo de estos marcadores periféricos sí permite distinguir entre personas que permanecen estables, controles que convierten a DCL, y controles que convierten a EA (Blasko *et al.*, 2008).

Si bien todas estas evidencias sugieren que el incremento de A β plasmático mostrado por los DCLa podría ser un reflejo de la amiloidosis cerebral subyacente, la prueba más evidente es la relación observada entre el incremento de las concentraciones de A β plasmático y la disminución de espesor cortical en regiones afectadas por la EA, así como su relación con las alteraciones del sueño, las cuales explican a su vez parte de la atrofia cortical observada en estos pacientes (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2014; Anexo I). Todos estos aspectos se discutirán en los siguientes apartados.

5.2. El incremento de las concentraciones plasmáticas de A β está asociado a disminuciones del espesor cortical en pacientes con DCLa

El presente estudio reveló que el aumento de las concentraciones plasmáticas de A β_{1-40} y A β_{1-42} observado en pacientes con DCLa está asociado a una disminución del espesor cortical en el cíngulo posterior y en la corteza entorrinal, respectivamente (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2014; Anexo I); dos estructuras profundamente afectadas desde la fase prodrómica de la EA (Jessen *et al.*, 2006; Choo *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2016). Hasta nuestro conocimiento, solo un estudio ha evaluado anteriormente la relación entre las concentraciones plasmáticas de A β y los cambios en la estructura cerebral en pacientes con DCL, aunque los resultados fueron contrarios a los nuestros. Es decir, cuanto menores fueron las concentraciones plasmáticas de A β_{1-42} mayor fue la reducción del volumen del hipocampo (Poljak *et al.*, 2016).

Las diferencias entre ambos estudios podrían deberse, entre otros factores, a los cambios que sufren las concentraciones plasmáticas de A β_{1-42} con la progresión de la enfermedad. Estudios realizados en modelos experimentales de amiloidosis (Kawarabayashi *et al.*, 2001; Izco *et al.*, 2014) y en humanos (Fukumoto *et al.*, 2003; Mayeux *et al.*, 2003; López *et al.*, 2008) han mostrado que los niveles plasmáticos de A β están incrementados al comienzo de la enfermedad pero disminuyen conforme aumentan los agregados de A β cerebral. Por ejemplo, en el estudio de Schupf y colaboradores (2008), los niveles elevados de A β_{1-42} en la línea base triplicaron el riesgo de desarrollar la EA, mientras que la conversión se acompañó de una disminución en dichas concentraciones. En línea con estos resultados, Blasko *et al.* (2008) observaron que el incremento progresivo de las concentraciones plasmáticas de A β_{1-42} durante un periodo de 2 años y medio fue capaz de distinguir a los controles que permanecían estables de aquellos que desarrollaron DCL o EA, siendo menores los incrementos de A β_{1-42} en los DCL que convirtieron a EA.

Teniendo en cuenta la variabilidad de resultados en relación con las concentraciones de A β plasmático y la heterogeneidad intrínseca al concepto de DCL, existe la posibilidad de que los pacientes de nuestro estudio y los utilizados por Poljak *et al.* (2016) se encontraran en diferentes fases del continuum envejecimiento-EA. De hecho, hace unos años se introdujo la

distinción entre DCL temprano y tardío basado en la severidad del recuerdo demorado (Aisen *et al.*, 2010). Esta interpretación se ve también respaldada por estudios conducidos en personas mayores no dementes. En uno de estos estudios se encontró que las personas mayores sanas que mostraban niveles más altos de A β_{1-42} (utilizando la mediana como punto de corte) también presentaban una mayor reducción del espesor cortical del polo temporal derecho (Lladó-Saz *et al.*, 2015). Si a esto se añadía la presencia de quejas subjetivas de memoria, el incremento de A β_{1-42} se acompañaba de una reducción del volumen del giro dentado (Cantero *et al.*, 2016), uno de los nichos de neurogénesis más importantes en humanos (Eriksson *et al.*, 1998).

Al igual que en el presente estudio, otros trabajos han puesto de manifiesto la relación existente entre el incremento de los niveles plasmáticos de A β_{1-40} y las atrofiaciones de la corteza cerebral. Por ejemplo, en el estudio de Lladó-Saz *et al.* (2015), realizado en personas mayores normales, aquellos que presentaron niveles más altos de A β_{1-40} también mostraron una disminución del espesor cortical en regiones prefrontales. En esta dirección, otro estudio reciente ha mostrado que el incremento de las concentraciones plasmáticas de A β_{1-40} y la disminución de la ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} están significativamente relacionadas con cambios de volumen del hipocampo en la línea base y con una progresión más rápida de la atrofia cerebral en los cuatro años siguientes (Kaffashian *et al.*, 2015). Parece, por tanto, que las concentraciones plasmáticas de diferentes péptidos de A β podrían estar relacionadas con diferentes cambios cerebrales en función del fenotipo cognitivo que presenten los individuos, aunque se desconoce si estos aspectos están de alguna manera relacionados con la patología de la EA. Así, por ejemplo, en un estudio en el que se determinaron las concentraciones plasmáticas de A β , se observó que el incremento del A β_{1-40} guardaba una estrecha relación con la disminución del volumen del hipocampo izquierdo, independientemente de que los individuos fueran controles o pacientes con DCL/EA (Sotolongo-Grau *et al.*, 2014). Este resultado respalda la hipótesis de que la asociación entre los niveles plasmáticos de A β_{1-40} y el volumen del hipocampo podría estar relacionada con procesos de envejecimiento más que con el fenómeno neurodegenerativo propio de la EA. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren

que las concentraciones de los diferentes péptidos de A β en sangre periférica tienen un significado biológico que podría estar relacionado con procesos de vulnerabilidad y/o fragilidad durante el envejecimiento, en el caso del A β ₁₋₄₀, y/o con el curso de la patofisiología de la EA, en el caso del A β ₁₋₄₂. De confirmarse esta hipótesis, las correlaciones entre los niveles plasmáticos de A β ₁₋₄₂ y la reducción de espesor de la corteza entorrinal observada en los pacientes con DCLa del presente estudio podrían estar reflejando procesos subyacentes a la patología de la EA.

5.3. El incremento de los niveles plasmáticos de A β está asociado a alteraciones del sueño en pacientes con DCLa

Evidencias recientes sugieren que las fases prodrómicas de la EA cursan con alteraciones de la estructura del sueño (Hita-Yáñez *et al.*, 2012; Westerberg *et al.*, 2012), y que dichas alteraciones podrían estar relacionadas con la patología amiloidea que caracteriza a la EA, aspecto que ha sido puesto de manifiesto en roedores (Kang *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2012) y humanos (Ju *et al.*, 2013; Spira *et al.*, 2013; Ooms *et al.*, 2014; Sprecher *et al.*, 2015; Branger *et al.*, 2016). Sin embargo, el presente estudio es el primero en demostrar que los niveles de fragmentación del SOL que sufren los pacientes con DCLa se asocian a incrementos en las concentraciones plasmáticas de A β ₁₋₄₂ (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2014; Anexo I).

Al tratarse de un estudio correlacional no es posible determinar si son las concentraciones de A β las que causan las alteraciones del sueño o *vice versa*. Estudios previos respaldan ambas posibilidades. Por ejemplo, experimentos realizados con modelos murinos han mostrado que la privación crónica de sueño incrementa hasta un 25% los niveles cerebrales de A β soluble (Kang *et al.*, 2009), mientras que otros trabajos han revelado que la aparición de los primeros agregados de A β en ratones APP-PS1 se acompañan de un incremento de la vigilia durante los periodos de sueño y de una disminución del SOL y de la fase REM (Roh *et al.*, 2012). Si consideramos que la aparición de los agregados de A β ocurre en estadios más avanzados de la EA coincidiendo con la disminución de las concentraciones plasmáticas de A β ₁₋₄₂ (Izco *et al.*,

2014), cabría hipotetizar que la relación encontrada en el presente estudio podría estar más relacionada con los niveles cerebrales de A β soluble. En línea con esta idea, y teniendo en cuenta las variaciones circadianas a las que está sometido el patrón de expresión de A β (Kang *et al.*, 2009), se ha especulado con la posibilidad de que dichas alteraciones del sueño puedan promover la acumulación cerebral de los péptidos más neurotóxicos de A β , facilitando así la progresión de la enfermedad (Roh *et al.*, 2012). Trabajos realizados con *Drosophila* han confirmado igualmente el impacto del sueño sobre el metabolismo del A β (Dissel *et al.*, 2015; Tabuchi *et al.*, 2015; Gerstner *et al.*, 2016), mostrando que la reducción experimental del tiempo de quietud motora (equiparable a la privación de sueño en mamíferos) incrementa la acumulación del A β y los niveles de excitabilidad neuronal, activando un mecanismo de retroalimentación positiva que facilita la progresión de la EA (Tabuchi *et al.*, 2015).

Este amplio conjunto de evidencias apunta a que la fragmentación del sueño, causada por un incremento de arousals y/o por una mayor frecuencia de despertares, podría potenciar la expresión de A β y, mediante disfunciones en los mecanismos de aclaramiento y agregación, alterar la homeostasis entre los niveles de A β cerebral y el de sangre periférica. Esta hipótesis está respaldada por estudios que muestran que las personas con peor calidad de sueño, ya sea por problemas respiratorios (Yaffe *et al.*, 2011), alteraciones del ciclo circadiano (Tranah *et al.*, 2011), insomnio (Osorio *et al.*, 2011), disminución del tiempo total de sueño (Hahn *et al.*, 2014) o sueño excesivamente superficial (Lim *et al.*, 2013), presentan un riesgo más elevado de padecer DCL/EA. De hecho, trabajos realizados en modelos experimentales y humanos han revelado que la privación crónica de sueño promueve la acumulación cerebral de A β y tau (Kang *et al.*, 2009; Di Meco *et al.*, 2014; Ooms *et al.*, 2014), lo que a su vez conlleva un incremento de los niveles de estrés oxidativo (D'Almeida *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Mathangi *et al.*, 2012; Villafuerte *et al.*, 2015) y disfunciones en la función de la BHE (Gómez-González *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014; Hurtado-Alvarado *et al.*, 2016), alteraciones todas ellas importantes para la patología de la EA.

Estudios recientes han mostrado que el aclaramiento del A β ocurre de manera más efectiva mientras dormimos, aspecto que podría estar facilitado por el incremento de la actividad del sistema glinfático durante el sueño (Xie *et al.*, 2013). Este sistema permite al LCE desplazarse rápidamente por todo el cerebro con el objetivo de eliminar metabolitos y/o sustancias de desecho generadas durante la vigilia. De manera general, el LCE subaracnoideo se introduce en los espacios de Virchow-Robin para luego ser transportado al parénquima cerebral mediante canales gliales de agua denominados aquaporinas (AQP4). Una vez allí, el LCE arrastra el fluido intersticial hacia los espacios que rodean las venas principales y de allí salen del cerebro hacia el sistema linfático cervical (Jessen *et al.*, 2015). El volumen del sistema intersticial del cerebro incrementa alrededor del 60% durante el sueño, facilitando la circulación del fluido intersticial y, por ende, las posibilidades de aclaramiento del A β y de otros productos tóxicos y/o de desecho (Xie *et al.*, 2013). Experimentos con ratones a los que se les eliminaron los canales de AQP4, mostraron que el aclaramiento del A β se reducía hasta en un 65% (Iliff *et al.*, 2012). Por lo tanto, es posible que el incremento de la fragmentación del SOL que presentaron los pacientes con DCL/EA esté alterando la funcionalidad del sistema glinfático, promoviendo la acumulación y posterior agregación del A β cerebral.

Las alteraciones del sueño observadas en el DCL/EA podrían también ser el resultado de una hiperactivación del sistema orexinérgico (Liguori *et al.*, 2014; Roh *et al.*, 2014; Unit *et al.*, 2014). Las orexinas son neuropéptidos sintetizados en el hipotálamo lateral y posterior (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998) que además de modular funciones como la actividad locomotora, alimentación y conductas de motivación y de respuesta ante el estrés, participan activamente en el mantenimiento de la vigilia (Peyron *et al.*, 1998; Saper *et al.*, 2005). Estudios realizados en ratones transgénicos (Mäkelä *et al.*, 2010) y en pacientes con EA (Liguori *et al.*, 2016) han mostrado que el aumento de las concentraciones de orexina en LCE correlaciona con la reducción del sueño REM y con la fragmentación del SOL, las típicas alteraciones del sueño descritas en la fase prodrómica de la EA (Hita-Yáñez *et al.*, 2012). Como se ha expuesto anteriormente, la privación de sueño no solo incrementa los niveles de orexina (Pedrazzoli *et al.*, 2004) sino que también modula la dinámica fisiológica de los péptidos solubles de A β (Kang

et al., 2009). Por otra parte, hay evidencias de que los niveles de orexina correlacionan con incrementos de las concentraciones de tau (Deuschle *et al.*, 2014) y de $A\beta_{1-42}$ (Slats *et al.*, 2012) en LCE de pacientes con EA. Además, estudios *post mortem* en pacientes con EA han revelado reducciones de hasta un 40% del número de neuronas productoras de orexina en regiones del hipotálamo (Fronczek *et al.*, 2012), resultado que contribuiría a explicar las alteraciones del ritmo vigilia-sueño que caracterizan a estos pacientes.

Al contrario de lo que ocurrió con la disminución del sueño REM, que discutiremos en el siguiente apartado, la fragmentación del SOL no guardó relación alguna con los cambios de espesor cortical en los pacientes con DCLa. Sin embargo, los incrementos de $A\beta_{1-42}$ en plasma correlacionaron con las disminuciones del espesor de la corteza entorrinal. Por lo tanto, se concluye que la fragmentación del SOL, aunque no tenga un impacto directo sobre la integridad de la corteza entorrinal en los pacientes con DCLa, podría facilitar su deterioro promoviendo la acumulación y posterior agregación del $A\beta$ cerebral a través de los diferentes mecanismos discutidos anteriormente.

5.4. La disminución del sueño REM está relacionada con reducciones del espesor cortical en pacientes con DCLa

Los resultados del presente trabajo evidenciaron que la disminución del porcentaje de sueño REM en los pacientes con DCLa estaba asociado a reducciones del espesor cortical en el cíngulo posterior y precúneo del hemisferio izquierdo así como en el giro postcentral a nivel bilateral (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2014; Anexo I).

La corteza cíngulada es un área especialmente vulnerable en la EA como se deriva de estudios neuropatológicos (Brun & Englund, 1981; Driscoll *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2013; Henstridge *et al.*, 2015) y de neuroimagen estructural (Baron *et al.*, 2001; Ishii, 2005; Lehmann *et al.*, 2010) y funcional (Minoshima *et al.*, 1997; Herholz *et al.*, 2002; Nestor *et al.*, 2003; Koivunen *et al.*, 2011). Dentro de la corteza cíngulada, las regiones posteriores son las que presentan daños estructurales más evidentes desde la fase prodrómica (Chetelat *et al.*, 2002; Choo *et al.*, 2010).

Las áreas ventrales de la corteza cingulada posterior participan en procesos de recuperación de la memoria y planificación (Maddock *et al.*, 2001), mientras que las regiones dorsales, a través de sus conexiones con la corteza prefrontal, contribuyen a mantener el foco atencional (Leech & Sharp, 2014). Todos estos dominios cognitivos se ven afectados desde las fases preclínicas de la EA (Perrotin *et al.*, 2012). De hecho, en un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio se ha observado que la potencia espectral de las oscilaciones alfa en la corteza cingulada posterior durante la codificación y posterior recuperación de la memoria no solo correlacionaba con los déficits de memoria en los pacientes con DCLa, sino que dichas oscilaciones alfa en combinación con el volumen de la amígdala eran capaces de predecir la conversión a EA dos años antes del diagnóstico con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 82% (Prieto del Val *et al.*, 2016). Aparte de su contribución a los procesos de memoria, la disminución de la conectividad funcional de la corteza cingulada se ha relacionado con la apatía, desinhibición y disminución de conciencia que caracteriza a los pacientes con EA (Amanzio *et al.*, 2011).

El precúneo es otra de las estructuras corticales afectadas desde estadios tempranos de la EA. Trabajos previos realizados en pacientes con DCL han mostrado que esta región cerebral presenta una disminución del consumo metabólico de glucosa (Morbelli *et al.*, 2010; Bailly *et al.*, 2015), un incremento de la retención del trazador PET-PiB (Devanand *et al.*, 2010) y un mayor grado de atrofia cuando se compara con controles (Apostolova *et al.*, 2007; Risacher *et al.*, 2009; Spulber *et al.*, 2012). Esta vulnerabilidad, evidente desde los inicios de la enfermedad (Rowe *et al.*, 2007; Driscoll *et al.*, 2012), podría explicar la disminución de la conectividad funcional de la red neural por defecto en el DCL/EA (Rombouts *et al.*, 2005). De hecho, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han mostrado que las alteraciones de la conectividad funcional EEG que presentan los pacientes con DCLa están relacionadas con cambios de volumen del precúneo (González-Escamilla *et al.*, 2015).

Los resultados evidenciaron asimismo una relación entre la disminución de la duración del sueño REM y la reducción del espesor cortical en el giro postcentral (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2014; Anexo I), una estructura menos representativa de la EA si se compara con el precúneo y

la corteza cingulada posterior, pero que también presenta anomalías funcionales en el transcurso de la EA. De hecho, la correlación interhemisférica entre regiones homólogas del giro postcentral está anormalmente reducida en pacientes con EA (He *et al.*, 2008) y la disminución del espesor cortical en esta región es especialmente evidente en pacientes con DCL portadores de las variantes genéticas *APOE4* y *MAPT H1/H1* (Goñi *et al.*, 2013). Por otra parte, la combinación del espesor cortical con características topológicas de la red que incluyen a esta región, entre otras, predice la conversión de DCL a EA (Wei *et al.*, 2016), y los patrones de conectividad funcional entre el giro postcentral y el tálamo están significativamente alterados en pacientes con DCL (Zhou *et al.*, 2013). Además, los receptores nicotínicos de la acetilcolina no solo están reducidos en el núcleo basal de Meynert (Araujo *et al.*, 1988; Shimohama *et al.*, 1986) sino también en el giro postcentral de los pacientes con EA (London *et al.*, 1989). Este aspecto podría contribuir a explicar, al menos parcialmente, la relación entre la disminución del espesor cortical en el giro postcentral y la reducción del sueño REM en los pacientes con DCLa de nuestro estudio, dado el papel que juega la acetilcolina en la generación de la desincronía EEG que caracteriza al sueño REM (Vázquez & Baghdoyan, 2001; Berntson *et al.*, 2002).

El daño colinérgico que muestran los pacientes con DCL/EA podría a su vez retroalimentar la neuropatología de la EA, a través de un círculo vicioso mediante el cual la muerte de neuronas colinérgicas promovería la producción de A β y la neurotoxicidad asociada, incrementando el déficit colinérgico, lo que finalmente se traduciría en una mayor fosforilación de tau (Mesulam, 2004). De hecho, experimentos recientes han mostrado que la atrofia del núcleo basal de Meynert precede a las atrofas de la corteza entorrinal (Schmitz *et al.*, 2016). Además, estudios neuropatológicos han confirmado la existencia de una correlación positiva entre el número de ONF y la degeneración colinérgica en pacientes con EA (Geula *et al.*, 1998). En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que las alteraciones del sueño REM que muestran los pacientes con DCLa podrían estar causadas por las lesiones colinérgicas que caracterizan a la EA desde sus fases más tempranas.

5.5. La calidad del sueño como mediador de la relación entre HCY y TAC en pacientes con DCLa

Los pacientes con DCLa mostraron un menor porcentaje de sueño REM y una mayor fragmentación del SOL, alteraciones que, sin embargo, no se tradujeron en una peor calidad de sueño (Hita-Yáñez *et al.*, 2012). Aún así, en el presente trabajo hemos observado que determinados parámetros relacionados con la calidad de sueño, como la duración y la eficiencia del sueño, estaban significativamente relacionados con el incremento de HCY y la disminución de la TAC. Además, los análisis de mediación revelaron que la relación inversa entre HCY y TAC estaba mediada por la duración y la eficiencia del sueño (Sánchez-Espinosa *et al.*, en revisión; Anexo II). A continuación discutiremos cada una de las pautas que relacionan estos tres elementos, HCY-TAC, HCY-SUEÑO y SUEÑO-TAC, con el objetivo de entender mejor cómo esta relación podría llegar a impactar sobre la patología de la EA.

HCY-TAC. Numerosas evidencias han puesto de manifiesto que los niveles elevados de estrés oxidativo son un factor clave en la patogénesis de la EA (para una revisión, ver Persson *et al.*, 2014), sobre todo cuando se mide en el compartimento lipídico obtenido a partir de suero, eritrocitos y linfocitos circulantes (Schrag *et al.*, 2013). Aunque este hecho es extrapolable a los antioxidantes cerebrales y plasmáticos (Jiménez-Jiménez *et al.*, 1997; Baldeiras *et al.*, 2008), las evidencias no son tan claras cuando se trata de la TAC (Schrag *et al.*, 2013). Aun así, varios estudios han informado reducciones significativas de la TAC en pacientes con EA familiar (Cecchi *et al.*, 2002), con EA esporádica (Repetto *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2001; Zafrilla *et al.*, 2006; Kharrazi *et al.*, 2008; Aldred *et al.*, 2010; Cristalli *et al.*, 2012; Moslemnezhad *et al.*, 2016), sobre todo si son portadores del genotipo *APOE4* (Pulido *et al.*, 2005), y en pacientes con DCL (Guidi *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2016).

Uno de los factores que contribuyen a la producción de ROS es el incremento de las concentraciones de HCY, que a su vez es un importante factor de riesgo para la EA (Seshadri *et al.*, 2002). El citado estudio mostró, por primera vez en humanos, que los individuos con niveles de HCY superiores a 14 $\mu\text{mol/l}$ casi duplicaban el riesgo de desarrollar EA y que un

incremento de 5 $\mu\text{mol/l}$ incrementaba dicho riesgo en un 40%. En favor de la hipótesis que postula que los niveles de HCY están relacionados con el daño oxidativo, están las evidencias que demuestran que los pacientes con EA y con DCL presentan concentraciones elevadas de HCY y reducidas de TAC (Guidi *et al.*, 2006). Aunque los niveles de HCY no difirieron entre los DCLa y controles de nuestro estudio, casi la mitad de los pacientes con DCLa presentaron valores clínicos de HCY ($>14 \mu\text{mol/l}$) frente al 28% de los controles. Y lo que es más importante, solo los DCLa mostraron una correlación negativa entre ambos marcadores que además fue significativamente diferente de los controles.

La ausencia de diferencias en los valores de HCY al comparar DCL y controles ya ha sido informada anteriormente (Cervellati *et al.*, 2014), sugiriéndose incluso que los niveles elevados de HCY podrían estar más ligados a la demencia vascular que a la EA. Sin embargo, otros experimentos han revelado que los niveles de HCY podrían ser más o menos informativos sobre la progresión de la EA dependiendo del estadio de la enfermedad en el que se realizan las medidas (Blasko *et al.*, 2008). En particular, estos autores observaron que el grado de atrofia del lóbulo temporal medial junto con el incremento de HCY fueron capaces de predecir la conversión de controles a EA, pero no discriminaron los controles que convertían a DCL ni los DCL que convertían a EA. Además, otro estudio ha mostrado que los niveles de HCY y el volumen del hipocampo están estrechamente relacionados en pacientes con DCL, pero que dicha relación es independiente de la carga vascular y de la carga de amiloide (Choe *et al.*, 2014). Como discutiremos más abajo, es posible que la carga de $A\beta$ cerebral actúe como mediador de la relación entre la calidad de sueño y la TAC, más que como mediador de la relación entre HCY y atrofia del lóbulo temporal medial. No obstante, primero discutiremos los posibles mecanismos por los cuales los niveles elevados de HCY podrían afectar a la calidad del sueño.

HCY-SUEÑO. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que demuestra la existencia de una relación inversa entre los niveles de HCY y la calidad del sueño en pacientes con DCLa. Estudios previos han encontrado una relación similar en contextos diferentes al de la EA. Por ejemplo, las concentraciones elevadas de HCY se han relacionado con un incremento de la somnolencia en la población general (Zhang *et al.*, 2016), con una peor calidad de sueño en mujeres embarazadas (Rajendiran *et al.*, 2015), y con la realización de turnos de trabajo nocturnos en conductores de autobús (Martins *et al.*, 2003). Estos trabajos apuntan a una relación entre el incremento de los niveles de HCY y la calidad del sueño, sin embargo se desconocen los mecanismos subyacentes. El hecho que la misma relación pueda evidenciarse en contextos tan diferentes apunta a que estos mecanismos podrían no ser específicos de la EA.

Los posibles mediadores de la relación entre HCY y TAC que se ilustran de forma esquemática en la **Figura 19** podrían explicar en parte la relación entre HCY y sueño en pacientes con DCLa. Estudios realizados en cultivos neuronales han revelado que tanto el incremento de HCY como de los niveles de cobre (Cu) agravan el daño oxidativo en las neuronas (White *et al.*, 2001; Linnebank *et al.*, 2006), por lo que el Cu podría ser uno de los factores que está mediando la relación entre el incremento de los niveles de HCY y la agregación de A β (Keskitalo *et al.*, 2014). De esta forma, cuando las concentraciones de Cu exceden los niveles fisiológicos, éste se libera en forma de complejos de bajo peso molecular para finalmente acumularse en diversos tejidos del organismo, incluyendo el tejido cerebral (Hartter & Barnea, 1988). Bajo estas condiciones, el Cu actúa modificando selectivamente uno de los transportadores del A β , el LRP1, lo cual altera el sistema de aclaramiento del A β que posteriormente conducirá a un incremento en la agregación de A β cerebral (Singh *et al.*, 2013). Como se verá a continuación, este aumento en la acumulación de A β cerebral podría ser un elemento clave del círculo vicioso por su relaciones recíprocas con el sueño.

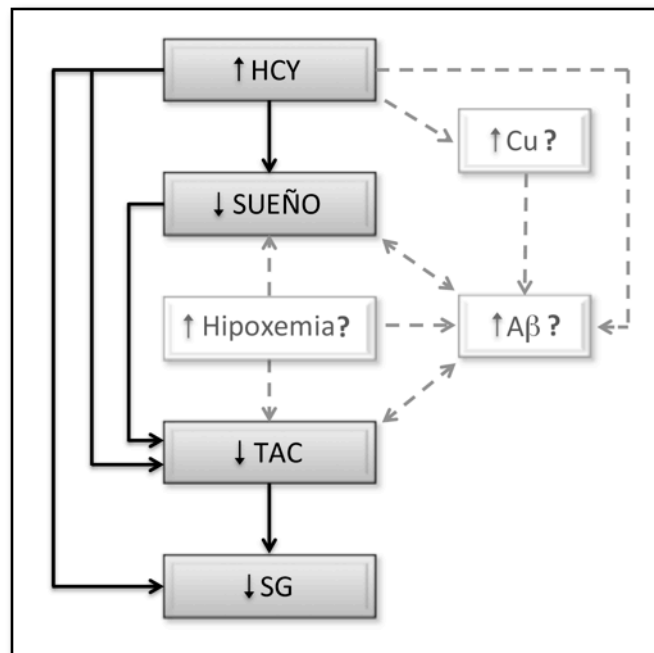


Figura 19. Modelo basado en las relaciones entre los marcadores empleados en el presente estudio, el Cu y los problemas respiratorios durante el sueño. Los recuadros en gris y las flechas continuas en negro representan resultados derivados del presente estudio y la naturaleza hipotética de dicha relación; mientras que los recuadros en blanco y las flechas discontinuas en gris representan factores que podrían jugar un papel relevante en el modelo causal sugerido, a pesar de que aún no han sido validados experimentalmente. Brevemente, nuestros resultados sugieren que la relación entre el incremento de HCY y la disminución de la TAC estaría mediada por la calidad del sueño en pacientes con DCLa, mientras que la relación entre el incremento de HCY y la disminución de volumen de la sustancia gris (SG) de regiones de la corteza temporal estaría mediada por la relación existente entre la calidad del sueño y la disminución de la TAC. Basándonos en evidencias derivadas de otros estudios, postulamos que la relación entre HCY y TAC también podría estar influida por la acumulación de Cu y/o por la agregación de A β cerebral (Squitti *et al.*, 2014), y que la disminución de la calidad de sueño podría estar exacerbada por un incremento de la hipoxemia (Polotsky *et al.*, 2006), lo que facilitaría además la agregación del A β cerebral (Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016).

El papel del Cu como mediador de la relación entre los niveles de HCY y la calidad del sueño en pacientes con DCLa encuentra soporte experimental en estudios previos realizados en humanos. Por ejemplo, los niveles séricos de Cu libre no solo son capaces de distinguir a los DCL de los controles (Squitti *et al.*, 2011), sino que también predicen la conversión de DCL a EA (Squitti *et al.*, 2014). No obstante, la relación entre HCY, Cu y A β , y su posible interacción con el sueño en los pacientes con DCL/EA necesita ser validada en futuros experimentos.

SUEÑO-TAC. Los resultados del presente trabajo mostraron además que la disminución de la calidad de sueño en los pacientes con DCLa está asociada a una reducción de la TAC, relación que se mantuvo incluso después de eliminar los posibles efectos de los niveles de HCY (Sánchez-Espinosa *et al.*, en revisión; Anexo II). Tal como se ilustra en la **Figura 19**, podría ocurrir que el incremento de A β (soluble o en agregados) juegue un papel determinante en esta relación, contribuyendo a generar un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del sistema para contrarrestar el daño oxidativo resultante. Esta hipótesis está fundamentada en las relaciones bidireccionales que parecen existir entre la privación de sueño y la formación de agregados de A β (Ju *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015; Musiek *et al.*, 2015; Roh *et al.*, 2015) y entre la presencia de agregados de A β y el daño oxidativo (Guglielmotto *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011).

El incremento del daño oxidativo podría deberse a fallos en la mitocondria, compartimento celular con una elevada concentración de ROS, que afecta a las vías de señalización de APP y tau (Lin & Beal, 2006). De hecho, son abundantes las evidencias que demuestran una relación recíproca entre la respuesta de estrés oxidativo y la producción de A β . Por ejemplo, diferentes estudios han observado que el incremento de la respuesta de estrés oxidativo aumenta la expresión de la enzima β -secretasa (Tamagno *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2005) y la fosforilación de tau (Lovell *et al.*, 2004), al mismo tiempo que el incremento del A β mitocondrial exacerba la respuesta celular de estrés oxidativo (Hensley *et al.*, 1994; Murakami *et al.*, 2005; Tabner *et al.*, 2005), inhibiendo la actividad de la enzima citocromo c oxidasa y aumentando la producción de radicales libres (Crouch *et al.*, 2005; Manczak *et al.*, 2006). Estos trabajos sugieren que la interacción entre la patología de la EA y la respuesta celular de estrés oxidativo podría reforzar un bucle de retroalimentación positiva que contribuya a acelerar la progresión de la enfermedad (Mao & Reddy, 2011).

Por otra parte, experimentos recientes han mostrado una relación entre la fragmentación y/o reducción del sueño y el incremento de la respuesta celular de estrés oxidativo (Williams *et al.*, 2016). En *Drosophila*, por ejemplo, la inducción de estrés oxidativo incrementa la fragmentación del periodo de quietud motora (Koh *et al.*, 2006), mientras que la privación de sueño en ratones

disminuye la expresión de enzimas antioxidantes (Ramanathan *et al.*, 2002). De hecho, los niveles de la proteína Sirtuin 3 (SirT3), cuya función es regular el estado redox dentro de la mitocondria, se ven disminuidos por los efectos directos del estrés oxidativo en respuesta a la privación de sueño (Zhang *et al.*, 2014). Además, la privación de sueño en humanos incrementa los niveles de enolasa neuroespecífica y S-100B en LCE, dos marcadores de daño neuronal (Benedict *et al.*, 2014). En conjunto, estos resultados sugieren que la falta de sueño compromete la proteostasis en el cerebro, repercutiendo en el proceso de producción y agregación de diversas proteínas relacionadas con el daño neuronal y la EA.

Alternativamente, podría darse el caso que la relación sueño-TAC que muestran los pacientes con DCLa esté causada (o exacerbada) por la presencia de eventos respiratorios durante el sueño. Esta posibilidad está respaldada por la elevada prevalencia de problemas respiratorios durante el sueño que muestran las personas mayores (Ancoli-Israel *et al.*, 1991) y por el hecho de que estos hallazgos respiratorios se relacionan con un mayor deterioro cognitivo en personas mayores normales (Osorio *et al.*, 2015) y con una mayor acumulación de A β cerebral en modelos animales de Alzheimer (Shiota *et al.*, 2013) y. De hecho, diferentes trabajos han puesto de manifiesto que la hipoxia intermitente podría ser un importante factor de riesgo para desarrollar EA (Sun *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016), debido a la fragmentación del sueño asociada y a los cambios estructurales concomitantes que ocurren en el hipocampo y en la corteza frontal, regiones estrechamente relacionadas con la formación de la memoria y con el control de las funciones ejecutivas (Morrell & Twigg, 2006). Además, la hipoxia incrementa los niveles de estrés oxidativo y exagera el deterioro cognitivo (Zhou *et al.*, 2016), principalmente por el daño cerebrovascular causado (Aliev *et al.*, 2003) y por el incremento de apoptosis en el hipocampo y la neocorteza (Gozal *et al.*, 2001). Aunque este conjunto de evidencias refuerza la idea de que los trastornos respiratorios durante el sueño podrían activar vías relacionadas con la neurodegeneración, queda por determinar si la presencia de alteraciones respiratorias durante el sueño contribuye de manera independiente o sinérgica a la relación encontrada entre la calidad de sueño y la reducción de la TAC en la fase prodrómica de la EA.

HCY-SUEÑO-TAC-SG. Un hallazgo que sustenta la relación entre HCY y TAC es que ambas medidas correlacionaron con reducciones de volumen de la misma región de la corteza temporal (**Figura 17**). Hasta nuestro conocimiento, esta sería la primera evidencia de que el estado oxidativo está relacionado con la integridad cerebral en pacientes con DCLa. Sin embargo, la relación entre el incremento de los niveles de HCY y las atrofas cerebrales ha sido previamente informada en personas mayores normales (Williams *et al.*, 2002; den Heijer *et al.*, 2003; Firbank *et al.*, 2010) y en pacientes con EA (Hogervorst *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009; Madsen *et al.*, 2015). Así, trabajos previos han mostrado que los efectos neurotóxicos de la HCY correlacionan con una pérdida de integridad de la SG cerebral (Madsen *et al.*, 2015), relación que avanza progresivamente en regiones del lóbulo temporal medial transcurridos 3 años (Clarke *et al.*, 1998). El incremento de los niveles de HCY también se ha relacionado con reducciones de volumen de la sustancia blanca cerebral (Hogervorst *et al.*, 2002; Sachdev, 2004; Kim *et al.*, 2009). De hecho, estudios previos han mostrado que el daño de la sustancia blanca en pacientes con EA incrementa un 40% cada 5 $\mu\text{mol/l}$ de HCY (Hogervorst *et al.*, 2002), lesiones que podrían tener un origen vascular dadas las relaciones entre el incremento de los niveles de HCY y el daño vascular observado en diferentes tipos de patologías (Wall *et al.*, 1980).

Los mecanismos que explican la relación entre los niveles elevados de HCY y la atrofia cerebral en la EA están comenzando a desvelarse (Sachdev, 2005). Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que esta relación parece ser independiente tanto de la carga vascular como de las concentraciones de A β cerebral (Choe *et al.*, 2014). Nuestros resultados no contradicen este hecho, pero de acuerdo con el modelo propuesto en la **Figura 19**, la carga de A β cerebral jugaría un papel importante al actuar como un potencial mediador de la relación entre el sueño y la TAC. De hecho, los resultados del presente estudio sugieren que el impacto de la HCY sobre la atrofia cerebral estaría mediado por la acción secuencial de los cambios acontecidos en el sueño y en el estado oxidativo (Sánchez-Espinosa *et al.*, en revisión; Anexo II).

Dado que el incremento de los niveles de HCY facilita la agregación del A β , contribuyendo de manera directa o indirecta a la atrofia cerebral y al deterioro cognitivo (Pacheco-Quinto *et al.*, 2006; Zhuo *et al.*, 2010; Li & Praticò, 2015; Chung *et al.*, 2016), diferentes trabajos han sugerido contrarrestar los efectos perniciosos de la HCY mediante la administración de vitamina B (Durga *et al.*, 2007; de Jager *et al.*, 2012; Ford & Almeida, 2012). De hecho, estudios previos han mostrado que la administración de vitamina B en pacientes con DCLa enlentece la progresión de la atrofia cerebral (Smith *et al.*, 2010) y reduce hasta siete veces el grado de atrofia de regiones cerebrales afectadas por la EA (Douaud *et al.*, 2013). Por lo tanto, los planes de prevención de la EA deberían contemplar la administración de suplementos de vitamina B en el caso de personas mayores asintomáticas que presenten elevados niveles de HCY. Esta intervención podría contribuir a retrasar el deterioro cognitivo y mantener la integridad cerebral (de Jager, 2014). Además, la suplementación con ácido fólico, con propiedades antiinflamatorias, ha mostrado mejorar las funciones cognitivas en pacientes con DCLa (Ma *et al.*, 2016), y disminuir el nivel de atrofia observada en regiones cerebrales vulnerables a la EA (McCully, 2016).

Algunos de los marcadores empleados en el presente estudio son modificables, aspecto que consideramos relevante de cara a su posible utilización para prevenir el deterioro cognitivo que precede al diagnóstico de la EA. Una primera vía de actuación podría dirigirse a mejorar la calidad del sueño en personas mayores en riesgo de desarrollar EA. Si nos atenemos a los resultados derivados del presente trabajo, esta estrategia podría contribuir a romper la relación entre HCY y TAC. En esta dirección, estudios previos han mostrado que las alteraciones del sueño correlacionan con la severidad del deterioro cognitivo en pacientes con DCLa (Westerberg *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2015) y en personas mayores no dementes (Johar *et al.*, 2016). Por lo tanto, prestar atención a las quejas de sueño en la consulta de atención primaria podría ofrecer nuevas oportunidades para atenuar y/o enlentecer el nivel de deterioro cognitivo en edades avanzadas.

Las deficiencias de determinados micronutrientes (especialmente vitaminas B1, B2, B6, B12, C, y ácido fólico) son frecuentes en las personas mayores y se han asociado con el deterioro

cognitivo que caracteriza al envejecimiento (Solfrizzi *et al.*, 2011). De hecho, los nutrientes contenidos en determinados alimentos pueden actuar bien de manera sinérgica o como antagonistas del deterioro cognitivo asociado a la EA (Staehelin, 2005). Por ejemplo, el déficit de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, y más en concreto del ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentanoico (EPA) se asocia a un mayor grado de deterioro cognitivo en enfermedades neurodegenerativas (Lukiw & Bazan, 2008). Además, el exceso de algunos micronutrientes (*e.g.*, hierro, selenio y cobre) o compuestos no nutricionales como el etanol, podrían aumentar la respuesta inflamatoria que caracteriza a la EA (Staehelin, 2005). Dado que tanto el incremento de los niveles de HCY como la disminución de las defensas antioxidantes están influidas por la dieta, podría ser también importante incorporar una evaluación nutricional en personas mayores con el objetivo de retrasar un posible deterioro cognitivo.

5.6. Limitaciones del estudio

El sueño de las personas mayores, sean normales o con diferentes grados de deterioro cognitivo, está afectado por factores intrínsecos al propio envejecimiento. Por ejemplo, un 50% de las personas mayores de 65 años presentan eventos respiratorios nocturnos, que aunque no tienen implicaciones clínicas podrían llegar a fragmentar el sueño de manera significativa (Pavlova *et al.*, 2008). Además, estos problemas respiratorios son más frecuentes en pacientes con DCLa que en mayores no dementes (Bombois *et al.*, 2010). A esto se une el hecho de que un 20% de las personas mayores de 80 años presentan trastornos motores durante el sueño (Phillips *et al.*, 2000). A pesar de que ninguno de los participantes en el presente estudio presentaba una historia clínica de estos trastornos, es posible que alguno de ellos los padecieran, aun cuando ni siquiera la pareja los informase. Desafortunadamente, este aspecto no pudo ser descartado objetivamente con el montaje de PSG empleado en este trabajo.

Los experimentos se realizaron con una muestra de tamaño reducido (21 casos por grupo), dada la dificultad para seleccionar pacientes con DCLa que quisieran participar voluntariamente en todas las pruebas (*i.e.*, evaluación neuropsicológica, extracción de sangre, estudio de PSG

nocturna y estudio de RM). Además, la variabilidad de algunos de los marcadores aquí empleados (e.g., sueño, A β , bioquímicas) y el diferente tiempo de almacenamiento de las muestras de sangre podría estar alterando algunos de los hallazgos informados o ensombreciendo otros resultados que se quedaron al límite de la significación. Este aspecto es especialmente importante en el caso de los marcadores bioquímicos empleados (HCY y TAC), ya que se ven afectados por factores como los ritmos circadianos, la dieta, el consumo crónico de medicamentos, etc. Aunque esta limitación es evidente, nos parece relevante mencionar que las diferencias en los niveles de TAC entre controles y DCLa del presente estudio fueron confirmadas con otras dos técnicas (FRAP y ABTS) diferentes al ORAC.

Por último, no se incluyeron determinaciones de los niveles de A β /tau en LCE o de la carga de A β cerebral con PET. A pesar de la variabilidad intrínseca de los marcadores de la EA en LCE, son los que mejor podrían reflejar el nivel de lesiones cerebrales asociados a la EA. Sin embargo, la naturaleza invasiva de esta técnica (punción lumbar) dificulta su uso en estudios con personas mayores asintomáticas o con signos muy leves de deterioro cognitivo. El PET se considera una técnica menos invasiva que la extracción de LCE, aunque los radiotrazadores de A β no estaban aprobados por la Agencia Nacional del Medicamento en el momento de realización de estos experimentos. Idealmente, nuestro trabajo debería haber incluido al menos uno de estos marcadores, lo que nos hubiera permitido determinar indirectamente la presencia/ausencia de patología de la EA en cada participante y, de esta forma, disminuir la heterogeneidad de la muestra e incrementar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

- Los pacientes con DCLa mostraron un incremento de las concentraciones plasmáticas de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ las cuales, a su vez, se relacionaron con diferentes aspectos de la EA. Así, el incremento de $A\beta_{1-40}$ correlacionó con disminuciones del espesor de la corteza cingulada posterior, mientras que el aumento de $A\beta_{1-42}$ correlacionó con reducciones del espesor de la corteza entorrinal así como con un incremento de la fragmentación del SOL. Dado que estos hallazgos no se observaron en el grupo control, podrían estar reflejando procesos relacionados con la patofisiología de la EA.
- La disminución del porcentaje de sueño REM que mostraron los pacientes con DCLa correlacionó con una reducción del espesor cortical en regiones que concentran agregados de $A\beta$ desde estadios muy tempranos (*i.e.*, cingulado posterior y precúneo) o que muestran una disminución de receptores nicotínicos colinérgicos en pacientes con EA (*i.e.*, giro postcentral). Dado el papel que juega la acetilcolina en los mecanismos de desincronización del EEG durante el sueño REM, las alteraciones de esta fase del sueño podrían ser un reflejo de las disfunciones colinérgicas asociadas a la EA, además de contribuir a facilitar la patología amiloidea en regiones afectadas por la EA.
- Nuestros resultados confirman que la relación entre el incremento de los niveles de HCY y la disminución de la TAC en sangre periférica emerge desde la fase prodrómica de la EA. Aunque ambos parámetros correlacionaron con una reducción del volumen de regiones del lóbulo temporal, la naturaleza de estas relaciones fue diferente en cada caso. Mientras que el estado antioxidante ejerció una influencia directa sobre la atrofia temporal, la influencia de la HCY estuvo mediada por la relación existente entre la calidad del sueño y el estado antioxidante.

CONCLUSIONS

- Patients with aMCI showed increased plasma concentrations of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$, which, in turn, were related to different aspects of AD. The increase of $A\beta_{1-40}$ correlated with thinning of the posterior cingulate cortex, whereas the increase of $A\beta_{1-42}$ correlated with reductions in the thickness of the entorhinal cortex as well as with an increase in the fragmentation of SWS. Since these findings were not observed in the control group, they could be reflecting processes related to the pathophysiology of AD.
- The decrease in the percentage of REM sleep in patients with aMCI correlated with a reduction in cortical thickness in regions that accumulate $A\beta$ aggregates from very early stages (*i.e.*, posterior cingulate and precuneus) or which showed a decrease in cholinergic nicotinic receptors in patients with AD (*i.e.*, postcentral gyrus). Given the role that acetylcholine plays in EEG desynchronization mechanisms during REM sleep, alterations in this sleep stage may be a reflection of the cholinergic dysfunctions associated with AD, in addition to helping to facilitate amyloid pathology in regions affected by the AD.
- Our results confirm that the relationship between the increase in HCY levels and the decrease in TAC in peripheral blood begins in the prodromal stage of AD. Although both parameters correlated with a reduction in the volume of temporal lobe regions, the nature of these relationships was different for each case. While the antioxidant status exerted a direct influence on temporal atrophy, the influence of HCY was mediated by the relationship between sleep quality and antioxidant status.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel T, Havekes R, Saletin JM, Walker MP (2013). Sleep, plasticity, and memory from molecules to whole-brain networks. *Curr Biol.* 23:R774-788.
- Aisen PS, Petersen RC, Donohue MC, Gamst A, Raman R, Thomas RG, Walter S, Trojanowski JQ, Shaw LM, Beckett LA, Jack CR, Jagust W, Toga AW, Saykin AJ, Morris JC, Green RC, Weiner MW; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2010). Clinical core of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: progress and plans. *Alzheimer's Dement.* 6:239-246.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21:383-421.
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Snyder PJ (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: report of the National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimer's Dement.* 7:270-279.
- Aldred S, Bennett S, Mecocci P (2010). Increased low-density lipoprotein oxidation, but not total plasma protein oxidation, in Alzheimer's disease. *Clin Biochem.* 43:267-271.
- Alexander GE, Chen K, Pietrini P, Rapoport SI, Reiman EM (2002). Longitudinal PET evaluation of cerebral metabolic decline in dementia: A potential outcome measure in Alzheimer's disease treatment studies. *Am J Psychiatry.* 159:738-745.
- Algaidi SA, Christie LA, Jenkinson AM, Whalley L, Riedel G, Platt B (2005). Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity. *Exp Neurol.* 197:8-12.
- Aliev G, Smith MA, Obrenovich ME, de la Torre JC, Perry G (2003). Role of vascular hypoperfusion-induced oxidative stress and mitochondria failure in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Neurotox Res.* 5:491-504.
- Altena E, Vrenken H, Van Der Werf YD, van den Heuvel OA, Van Someren EJ (2010). Reduced orbitofrontal and parietal gray matter in chronic insomnia: a voxel-based morphometric study. *Biol Psychiatry.* 67:182-185.
- Alzheimer's Association (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 12:459-509.
- Amanzio M, Torta DM, Sacco K, Cauda F, D'Agata F, Duca S, Leotta D, Palermo S, Geminiani GC (2011). Unawareness of deficits in Alzheimer's disease: role of the cingulate cortex. *Brain.* 134:1061-1076.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4th Edition). Washington, DC, American Psychiatric Association. 1994.
- American Sleep Disorder Association (1992). EEG arousals: scoring rules and examples. *Sleep.* 15:173-184.
- Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M (2010). Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women? *ARYA Atheroscler.* 2:189-192.
- Ancoli-Israel S, Kripke DF, Klauber MR, Mason WJ, Fell R, Kaplan O (1991). Sleep-disordered breathing in community-dwelling elderly. *Sleep.* 14:486-495.
- Ancoli-Israel S, Klauber MR, Jones DW, Kripke DF, Martin J, Mason W, Pat-Horenczyk R, Fell R (1997). Variations in circadian rhythms of activity, sleep, and light exposure related to dementia in nursing-home patients. *Sleep.* 20:18-23.
- Anderson NL, Anderson NG (2002). The human plasma proteome history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 1:845-867.

- Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, Venneria E, O'Connor JM, Maiani G, Coudray C, Rousset AM (2005). Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr.* 59:S58-62.
- Ansari MA, Scheff SW (2010). Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol.* 69:155-167.
- Antoniadis EA, Ko CH, Ralph MR, McDonald RJ (2000). Circadian rhythms, aging and memory. *Behav Brain Res.* 114:221-33.
- Apostolova LG, Steiner CA, Akopyan GG, Dutton RA, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM (2007). Three-dimensional gray matter atrophy mapping in mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 64:1489-1495.
- Araujo DM, Lapchak, PA, Robitaille Y, Gauthier S, Quirion R (1988). Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 50:1914-1923.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex.* 1:103-116.
- Aron A, Aron EN (2001). The self-expansion model of motivation and cognition in close relationships and beyond. In M Clark & G Fletcher (Eds), *Blackwell Handbook in Social Psychology, Vol. 2: Interpersonal Processes* Oxford: Blackwell; pp. 478-501.
- Ashburner J (2007). A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage.* 38:95-113.
- Assini A, Cammarata S, Vitali A, Colucci M, Giliberto L, Borghi R, Inglese ML, Volpe S, Ratto S, Dagna-Bricarelli F, Baldo C, Argusti A, Odetti P, Piccini A, Tabaton M (2004). Plasma levels of amyloid β -protein 42 are increased in women with mild cognitive impairment. *Neurology.* 63:828-831.
- Ayasolla K, Khan M, Singh AK, Singh I (2004). Inflammatory mediator and β -amyloid (25–35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Radic Biol Med.* 37:325-338.
- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A (2005). Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int.* 47:635-639.
- Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ (1993). Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology.* 43:515-519.
- Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 9:535-551.
- Bailly M, Destrieux C, Hommet C, Mondon K, Cottier JP, Beaufile E, Vierron E, Vercouillie J, Ibazizene M, Voisin T, Payoux P, Barré L, Camus V, Guilloteau D, Ribeiro M (2015). Precuneus and cingulate cortex atrophy and hypometabolism in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: MRI and 18F-FDG PET quantitative analysis using freesurfer. *BioMed Res Int.* 2015:583931.
- Baldeiras I, Santana I, Proença MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A, Duro D, Oliveira CR (2008). Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 15:117-128.
- Baron RM, Kenny DA (1986). The moderator-mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic and statistical considerations. *J Pers Soc Psychol.* 51:1173-1182.
- Baron JC, Chetelat G, Desgranges B, Percey G, Landeau B, De La Sayette V, Eustache F (2001). In vivo mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease. *Neuroimage.* 14:298-309.
- Barone E, Di Domenico F, Sultana R, Coccia R, Mancuso C, Perluigi M, Keller JN, Markesbery WR (2012). Heme oxygenase-1 posttranslational modifications in the brain of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med.* 52:2292-22301.
- Bartus RT, Dean RL II, Beer D, Lippa AS (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217:408-417.

- Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM (2006). Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med.* 12:856-861.
- Bateman RJ, Wen G, Morris JC, Holtzman DM (2007). Fluctuations of CSF amyloid- β levels Implications for a diagnostic and therapeutic biomarker. *Neurology.* 68:666-669.
- Bates KA, Sohrabi HR, Rodrigues M, Beilby J, Dhaliwal SS, Taddei K, Criddle A, Wraith M, Howard M, Martins G, Paton A, Mehta P, Foster JK, Martins IJ, Lautenschlager NT, Mastaglia FL, Laws SM, Gandy SE, Martins RN (2009). Association of cardiovascular factors and Alzheimer's disease plasma amyloid-beta protein in subjective memory complainers. *J Alzheimers Dis.* 17:305-318.
- Beaulieu-Bonneau S, Hudon C (2009). Sleep disturbances in older adults with mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr.* 21:654-666.
- Becker JT, Davis SW, Hayashi KM, Meltzer CC, Toga AW, Lopez OL, Thompson PM (2006). Three-dimensional patterns of hippocampal atrophy in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 63:97-101.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23:213-227.
- Belal C, Ameli NJ, El Kommos A, Bezalel S, Al'Khafaji AM, Mughal MR, Mattson MP, Kyriazis GA, Tyrberg B, Chan SL (2012). The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum (ER) stress protein Herp counteracts mutant α -synuclein-induced ER stress via the homeostatic regulation of ER-resident calcium release channel proteins. *Hum Mol Genet.* 21:963-977.
- Benedict C, Cedernaes J, Giedraitis V, Nilsson EK, Hogenkamp PS, Vagesjo E, Massena S, Pettersson U, Christoffersson G, Phillipson M, Broman JE, Lannfelt L, Zetterberg H, Schiöth HB (2014). Acute sleep deprivation increases serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and S100 calcium binding protein B (S-100B) in healthy young men. *Sleep.* 37:195-198.
- Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Vega S, Louis ED (2009). Total daily sleep duration and the risk of dementia: a prospective population-based study. *Eur J Neurol.* 16:990-997.
- Benzie IF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239:70-76.
- Benzinger TL, Blazey T, Jack CR Jr, Koeppe RA, Su Y, Xiong C, Cairns NJ (2013). Regional variability of imaging biomarkers in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:E4502-4509.
- Bernal-Rusiel JL, Atienza M, Cantero JL (2008). Detection of focal changes in human cortical thickness: spherical wavelets versus gaussian smoothing. *NeuroImage.* 41:1278-1292.
- Bernal-Rusiel JL, Atienza M, Cantero JL (2010). Determining the optimal level of smoothing in cortical thickness analysis: a hierarchical approach based on sequential statistical thresholding. *NeuroImage.* 52:158-171.
- Berntson GG, Shafi R, Sarter M (2002). Specific contributions of the basal forebrain corticopetal cholinergic system to electroencephalographic activity and sleep/waking behaviour. *Eur J Neurosci.* 16:2453-2461.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 39:17-23.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69:89-95.
- Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Fischer P (2008). Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging.* 29:1-11.
- Blasko I, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Jellinger K, Fischer P (2005). Plasma amyloid beta protein 42 in non-demented persons aged 75 years: effects of concomitant medication and medial temporal lobe atrophy. *Neurobiol Aging.* 26:1135-1143.
- Blasko S, Meléndez C (2006). Cambios en la memoria asociados al envejecimiento. *Geriátrika.* 22:179-185.

- Blennow K (2004). Cerebrospinal Fluid Protein Biomarkers for Alzheimer's Disease. *NeuroRx*. 1:213-225.
- Blennow K, Hampel H (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2:605-613.
- Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 6:131-144.
- Blennow K, Wallin A, Agren H, Spenger C, Siegfried J, Vanmechelen E (1995). Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol Chem Neuropathol*. 26:231-245.
- Bliwise DL, Watts RL, Watts N, Rye DB, Irbe D, Hughes M (1995). Disruptive nocturnal behavior in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 8:107-110.
- Blurton-Jones M, LaFerla FM (2006). Pathways by which A β facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res*. 3:437-448.
- Böhm P, Peña-Casanova J, Aguilar M, Hernandez G, Sol JM, Blesa R (1998). Clinical validity and utility of the interview for deterioration of daily living in dementia for spanish-speaking communities NORMACODEN Group. *Int Psychogeriatr*. 10:261-270.
- Bombois S, Derambure P, Pasquier F, Monaca C (2010). Sleep disorders in aging and dementia. *J Nutr Health Aging*. 14:212-217.
- Bonanni E, Maestri M, Tognoni G, Fabbrini M, Nucciarone B, Manca ML, Gori S, Iudice A, Murri L (2005). Daytime sleepiness in mild and moderate Alzheimer's disease and its relationship with cognitive impairment. *J Sleep Res*. 14:311-317.
- Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Corsini P, Cattabeni F, Padovani, A (2002). ApoE genotype influences the biological effect of donepezil on APP metabolism in Alzheimer disease: evidence from a peripheral model. *Eur Neuropsychopharmacol*. 12:195-200.
- Bottiglieri T, Parnetti L, Arning E, Ortiz T, Amici S, Lanari A, Gallai V (2001). Plasma total homocysteine levels and the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: a study in an Italian population with dementia. *Mech Ageing Dev*. 122:2013-2023.
- Bottino CM, Castro CC, Gomes RL, Buchpiguel CA, Marchetti RL, Neto MRL (2002). Volumetric MRI measurements can differentiate Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging. *Int Psychogeriatr*. 14:59-72.
- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 134:707-716.
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 99:459-496.
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschman H, Del Tredici K (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunohistochemistry. *Acta Neuropathol*. 112:389-404
- Braak H, Braak E (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82:239-259.
- Braak H, Del Tredici K (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol*. 121:171-181.
- Branger P, Arenaza-Urquijo EM, Tomadesso C, Mézenge F, André C, De Flores R, Mutlu J, de La Sayette V, Eustache F, Chételat G, Rauchs G (2016). Relationships between sleep quality and brain volume, metabolism, and amyloid deposition in late adulthood. *Neurobiol Aging*. 41:107-114.
- Brown MK, Chan MT, Zimmerman JE, Pack AI, Jackson NE, Naidoo N (2014). Aging induced ER stress alters sleep and sleep homeostasis. *Neurobiol Aging*. 35:1431-1441.
- Bruce-Keller AJ, Gupta S, Parrino TE, Knight AG, Ebenezer PJ, Weidner AM, LeVine H, Keller JN, Markesbery WR (2010). NOX activity is increased in mild cognitive impairment. *Antioxid Redox Signal*. 12:1371-1382.

- Brun A, Englund E (1981). Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology*. 5:549-564.
- Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov*. 8:783-793.
- Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, Wallin AK, Blennow K, Hansson O (2012). Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch Gen Psychiatry*. 69:98-106.
- Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, Sheline YI, Klunk WE, Mathis CA, Morris JC, Mintun MA (2005). Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci*. 25:7709-7717.
- Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, Hampel H (2006). CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 129:3035-3041.
- Burgess BL, Mclsaac SA, Naus KE, Chan JY, Tansley GH, Yang J, van Nostrand W (2006). Elevated plasma triglyceride levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse models with abundant A β in plasma. *Neurobiol Dis*. 24:114-127.
- Cai Z, Zhao B, Ratka A (2011). Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 13:223-250.
- Cantero JL, Zaborszky L, Atienza M (2016). Volume loss of the nucleus basalis of meynert is associated with atrophy of innervated regions in mild cognitive impairment. *Cereb Cortex*. 1:9.
- Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, Holtzman DM (2009). Caffeine suppresses β -amyloid levels in plasma and brain of Alzheimer's transgenic mice. *J Alzheimers Dis*. 17:681-697.
- Cao G, Prior RL (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*. 44:1309-1315.
- Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, Nassi P, Liguri G (2002). Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med*. 33:1372-1379.
- Cervellati C, Romani A, Seripa D, Cremonini E, Bosi C, Magon S, Passaro A, Bergamini CM, Pilotto A, Zuliani G (2014). Oxidative balance, homocysteine, and uric acid levels in older patients with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Neurol Sci*. 337:156-161.
- Chetelat G, Desgranges B, de la Sayette V, Viader F, Eustache F, Baron JC (2002). Mapping gray matter loss with voxel-based morphometry in mild cognitive impairment. *Neuroreport*. 13:1939-1943.
- Chi CH, Shiesh SC, Lin XZ (2002). Total antioxidant capacity and malondialdehyde in acute abdominal pain. *Am J Emerg Med*. 20:79-82.
- Chigurupati S, Wei Z, Belal C, Vandermeij M, Kyriazis GA, Arumugam TV, Chan SL (2009). The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein counteracts calcium store depletion and induction of CCAAT enhancer-binding protein homologous protein in a neurotoxin model of Parkinson disease. *J Biol Chem*. 284:18323-18333.
- Choe YM, Sohn BK, Choi HJ, Byun MS, Seo EH, Han JY, Kim YK, Yoon EJ, Lee JM, Park J, Woo JI, Lee DY (2014). Association of homocysteine with hippocampal volume independent of cerebral amyloid and vascular burden. *Neurobiol Aging*. 35:1519-1525.
- Choi DW, Rothman SM (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*. 13:171-182.
- Choo IH, Lee DY, Oh JS, Lee JS, Lee DS, Song IC, Woo JI (2010). Posterior cingulate cortex atrophy and regional cingulum disruption in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 31:772-779.
- Christen Y (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 71:2:S621-S629.

- Chung YC, Kruyer A, Yao Y, Feierman E, Richards A, Strickland S, Norris EH (2016). Hyperhomocysteinemia exacerbates Alzheimer's disease pathology by way of the β amyloid fibrinogen interaction. *J Thromb Haemost.* 14:1442-1452.
- Clark CM, Pontecorvo MJ, Beach TG, Bedell BJ, Coleman RE, Doraiswamy PM, Schneider JA (2012). Cerebral PET with florbetapir compared with neuropathology at autopsy for detection of neuritic amyloid- β plaques: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 11:669-678.
- Clark CM, Xie S, Chittams J (2003). Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol.* 60:1696-1702.
- Clark IA, Vissel B (2014). Inflammation-sleep interface in brain disease: TNF, insulin, orexin. *J Neuroinflammation.* 11:51.
- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM (1998). Folate, vitamin B12 and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 55:1449-1455.
- Collingridge GL, Singer W (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci.* 11:290-296.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small G, Pericak-Vance MA (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261:921-923.
- Costa RO, Ferreiro E, Cardoso SM, Oliveira CR, Pereira CM (2010). ER stress-mediated apoptotic pathway induced by A β peptide requires the presence of functional mitochondria. *J Alzheimers Dis.* 20:625-636.
- Covell GES, Dhawan PS, Iannotti JKL, Hoffman-Snyder CR, Wellik KE, Caselli RJ, Woodruff BK, Wingerchuk DM, Demaerschalk BM (2012). Disrupted daytime activity and altered sleep-wake patterns may predict transition to mild cognitive impairment or dementia: a critically appraised topic. *Neurologist.* 18:426-429.
- Cristalli DO, Arnal N, Marra F, de Alaniz M, Marra C (2012). Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci.* 314:48-56.
- Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccotosto GD, Li QX, Barnham KJ, Curtain CC, Cherny RA, Cappai R, Dyrks T, Masters CL, Trounce IA (2005). Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid- β 1-42. *J Neurosci.* 25:672-679.
- Cruts M, Van Broeckhoven C (1998). Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat.* 11:183-190.
- Cummings JL, Doody R, Clark C (2007). Disease-modifying therapies for Alzheimer disease: challenges to early intervention. *Neurology.* 69:1622-1634.
- Curtis C, Gamez JE, Singh U, Sadowsky CH, Villena T, Sabbagh MN, Walker Z (2015). Phase 3 trial of flutemetamol labeled with radioactive fluorine 18 imaging and neuritic plaque density. *JAMA Neurol.* 72:287-294.
- D'Almeida V, Lobo LL, Hipo lide DC, de Oliveira AC, Nobrega JN, Tufik S (1998). Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport.* 9:2853-2856.
- D'Onofrio G, Sancarolo D, Panza F, Copetti M, Cascavilla L, Paris F, Seripa D, Matera MG, Solfrizzi V, Pellegrini F, Pilotto A (2012). Neuropsychiatric symptoms and functional status in Alzheimer's disease and vascular dementia patients. *Curr Alzheimer Res.* 6:759-771.
- da Silva RA (2015). Sleep disturbances and mild cognitive impairment: A review. *Sleep Sci.* 8:36-41.
- Dale AM, Fischl B, Sereno MI (1999). Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *NeuroImage.* 9:179-194.
- Darby DG, Brodtmann A, Pietrzak RH, Fredrickson J, Woodward M, Villemagne VL, Fredrickson A, Maruff P, Rowe C (2011). Episodic memory decline predicts cortical amyloid status in community-dwelling older adults. *J Alzheimers Dis.* 27:627-637.
- Dávalos A, Bartolomé B, Suberviola J, Gómez-Cordovés C (2003). ORAC-fluorescein as a model for evaluating antioxidant activity of wines. *Pol J Food Nutr Sci.* 12:133-136.

- Davatzikos C, Fan Y, Wu X, Shen D, Resnick SM (2008). Detection of prodromal Alzheimer's disease via pattern classification of MRI. *Neurobiol Aging*. 29:514-523.
- Davies P, Maloney AJ (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2:1403.
- de Jager CA (2014). Critical levels of brain atrophy associated with homocysteine and cognitive decline. *Neurobiol Aging*. 35:S35-S39.
- de Jager CA, Oulhaj A, Jacoby R, Refsum H, Smith AD (2012). Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *Int J Geriatr Psychiatry*. 27:592-600.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:322-327.
- De Santi S, de Leon MJ, Rusinek H, Convit A, Tarshish CY, Roche A, Wang GJ (2001). Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiol Aging*. 22:529-539.
- Deane R, Bell R, Sagare A, Zlokovic B (2009). Clearance of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 8:16-30.
- Deane R, Wu Z, Zlokovic BV (2004). RAGE (Yin) versus LRP (Yang) balance regulates Alzheimer amyloid β -peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 11:S2628-S2631.
- den Heijer T, Vermeer SE, Clarke R, Oudkerk M, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM (2003). Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-demented elderly. *Brain*. 126:170-175.
- Detriex C, Fischl B, Dale A, Halgren E (2010). Automatic parcellation of human cortical gyri and sulci using standard anatomical nomenclature. *Neuroimage*. 53:1-15.
- Deuschle M, Schilling C, Leweke FM, Enning F, Pollmächer T, Esselmann H, Wiltfang J, Frölich L, Heuser I (2014). Hypocretin in cerebrospinal fluid is positively correlated with tau and ptau. *Neurosci Lett*. 561:41-45.
- Devanand DP, Mikhno A, Pelton GH, Cuasay K, Pradhaban G, Dileep Kumar JS, Upton N, Lai R, Gunn RN, Libri V, Liu X, van Heertum R, Mann JJ, Parsey RV (2010). Pittsburgh compound B (11C-PIB) and fluorodeoxyglucose (18F-FDG) PET in patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy controls. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 23:185-198.
- Di Meco A, Joshi YB, Praticò D (2014). Sleep deprivation impairs memory, tau metabolism, and synaptic integrity of a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neurobiol Aging*. 35:1813-1820.
- Dickerson BC, Stoub TR, Shah RC, Sperling RA, Killiany RJ, Albert MS, Blacker D (2011). Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology*. 76:1395-1402.
- Dickhout JG, Sood SK, Austin RC (2007). Role of endoplasmic reticulum calcium disequilibria in the mechanism of homocysteine-induced ER stress. *Antioxid Redox Signal*. 9:1863-1874.
- Dissel S, Angadi V, Kirszenblat L, Suzuki Y, Donlea J, Klose M, Koch Z, English D, Winsky-Sommerer R, van Swinderen B, Shaw PJ (2015). Sleep restores behavioral plasticity to *Drosophila* mutants. *Curr Biol*. 25:1270-1281.
- Doré V, Villemagne VL, Bourgeat P, Fripp J, Acosta O, Chetelat G, Zhou L, Martins R, Ellis KA, Masters CL, Ames D, Salvado O, Rowe CC (2013). Cross-sectional and longitudinal analysis of the relationship between A β deposition, cortical thickness, and memory in cognitively unimpaired individuals and in Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 70:903-911.
- Douaud G, Refsum H, de Jager CA, Jacoby R, Nichols TE, Smith SM, Smith AD (2013). Preventing Alzheimer's disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:9523-9528.
- Driscoll I, Troncoso JC, Rudow G, Sojkova J, Pletnikova O, Zhou Y, Kraut MA, Ferrucci L, Mathis CA, Klunk WE, O'Brien RJ, Davatzikos C, Wong DF, Resnick SM (2012). Correspondence between in vivo

- (11)C-PiB-PET amyloid imaging and postmortem, region matched assessment of plaques. *Acta Neuropathol.* 124:823-831.
- Drzezga A, Lautenschlager N, Siebner H, Riemenschneider M, Willoch F, Minoshima S, Kurz A (2003). Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 30:1104-1113.
- Du AT, Schuff N, Amend D, Laakso MP, Hsu YY, Jagust WJ, Yaffe K, Kramer JH, Reed B, Norman D, Chui HC, Weiner MW (2001). Magnetic resonance imaging of the entorhinal cortex and hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 71:441-447.
- Dubois B, Albert ML (2004). Amnestic MCI or prodromal Alzheimer's disease? *Lancet Neurol.* 3:246-248.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, Cappa S (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 13:614-629.
- Durga MP, van Boxtel EG, Schouten FJ, Kok J, Jolles MB, Katan P, Verhoef P (2007). Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet.* 369:208-216.
- Efron BR, Tibshirani RJ (1993). An Introduction to the Bootstrap, Chapman and Hall.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 4:1313-1317.
- Ertekin-Taner N, Younkin LH, Yager DM, Parfitt F, Baker MC, Asthana S, Hutton ML, Younkin SG, Graff-Radford NR (2008). Plasma amyloid {beta} protein is elevated in late-onset Alzheimer disease families. *Neurology.* 70:596-606.
- Faraci FM, Lentz SR (2004). Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke.* 5:345-347.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Van Duijn CM (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA.* 278:1349-1356.
- Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA (1987). MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol.* 149:351-356.
- Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M (2003). Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril.* 80:123-127.
- Ferrer M, Vilagut G, Monasterio C, Montserrat JM, Mayos M, Alonso J (1999). Measurement of the perceived impact of sleep problems: the Spanish version of the functional outcomes sleep questionnaire and the epworth sleepiness scale. *Med Clin.* 113:250-255.
- Figurski MJ, Waligórska T, Toledo J, Vanderstichele H, Korecka M, Lee VM (2012). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Improved protocol for measurement of plasma β -amyloid in longitudinal evaluation of Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative study patients. *Alzheimers Dement.* 8:250-260.
- Firbank MJ, Narayan SK, Saxby BK, Ford GA, O'Brien JT (2010). Homocysteine is associated with hippocampal and white matter atrophy in older subjects with mild hypertension. *Int Psychogeriatr.* 22:804-811.
- Fischl B, Dale AM (2000). Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11050-11055.
- Fischl B, Liu A, Dale AM (2001). Automated manifold surgery: constructing geometrically accurate and topologically correct models of the human cerebral cortex. *IEEE Trans Med Imaging.* 20:70-80.
- Fleisher AS, Chen K, Quiroz YT, Jakimovich LJ, Gomez MG, Langois CM, Langbaum JB, Ayutyanont N, Roontiva A, Thiyyagura P, Lee W, Mo H, Lopez L, Moreno S, Acosta-Baena N, Giraldo M, Garcia G, Reiman RA, Huentelman MJ, Kosik KS, Tariot PN, Lopera F, Reiman EM (2012). Florbetapir PET analysis of amyloid- β deposition in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer's disease kindred: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 11:1057-1065.

- Foley DJ, Monjan AA, Brown SL, Simonsick EM (1995). Sleep complaints among elderly persons: an epidemiologic study of three communities. *Sleep*. 18:425-432.
- Ford AH, Almeida OP (2012). Effect of homocysteine lowering treatment on cognitive function: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Alzheimers Dis*. 29:133-149.
- Forsberg A, Almkvist O, Engler H, Wall A, Långström B, Nordberg A (2010). High PIB retention in Alzheimer's disease is an early event with complex relationship with CSF biomarkers and functional parameters. *Curr Alzheimer Res*. 7:56-66.
- Forsberg A, Engler H, Almkvist O, Blomquist G, Hagman G, Wall A, Ringheim A, Långström B, Nordberg A (2008). PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 29:1456-1465.
- Förstl H, Kurz A (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 249:288-290.
- Frisoni GB, Fox NC, Jack CR, Scheltens P, Thompson PM (2010). The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 6:67-77.
- Fronczek R, Van Geest S, Frolich M, Overeem S, Roelandse FW, Lammers GJ, Swaab DF (2012). Hypocretin (orexin) loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 33:1642-1650.
- Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC (2003). Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol*. 60:958-964.
- Gagnon JF, Postuma RB, Mazza S, Doyon J, Montplaisir J (2006). Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*. 5:424-432.
- Ganguly-Fitzgerald I, Donlea J, Shaw PJ (2006). Waking experience affects sleep need in *Drosophila*. *Science*. 313:1775-1781.
- Gauthier SG (2005). Alzheimer's disease: the benefits of early treatment. *Eur J Neurol*. 3:11-16.
- Gauthier S, Albert M, Fox N, Goedert M, Kivipelto M, Mestre-Ferrandiz J, Middleton LT (2016). Why has therapy development for dementia failed in the last two decades? *Alzheimers Dement*. 12:60-64.
- GBD 2013. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 10:117-171.
- Gerstner JR, Lenz O, Vanderheyden WM, Chan MT, Pfeiffenberger C, Pack AI (2016). Amyloid- β induces sleep fragmentation that is rescued by fatty acid binding proteins in *Drosophila*. *J Neurosci Res*. 2016.
- Gerstner JR, Perron IJ, Pack AI (2012). The nexus of A β , aging, and sleep. *Sci Transl Med*. 4:150fs34.
- Geula C, Mesulam MM (1996). Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*. 6:165-177.
- Geula C, Mesulam MM, Saroff DM, Wu CK (1998). Relationship between plaques, tangles, and loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 57:63-75.
- Ghisso J, Shayo M, Calero M, Ng D, Tomidokoro Y, Gandy S, Frangione B (2004). Systemic catabolism of Alzheimer's A β 40 and A β 42. *J Biol Chem*. 279:45897-45908.
- Gloeckner SF, Meyne F, Wagner F, Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Zerr I (2008). Quantitative analysis of transthyretin, tau and amyloid-beta in patients with dementia. *J Alzheimers Dis*. 14:17-25.
- Goedert M, Jakes R (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*. 9:4225-4230
- Goel N, Basner M, Rao H, Dinges DF (2013). Circadian rhythms, sleep deprivation, and human performance. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 119:155-190.
- Gómez-González B, Hurtado-Alvarado G, Esqueda-Leon E, Santana-Miranda R, Rojas-Zamorano JA, Velazquez-Moctezuma J (2013). REM sleep loss and recovery regulates blood-brain barrier function. *Curr Neurovasc Res*. 10:197-207.
- Gómez-Isla T, Price JL, McKeel Jr, DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 16:4491-4500.

- Goñi J, Cervantes S, Arrondo G, Lamet I, Pastor P, Pastor MA (2013). Selective brain gray matter atrophy associated with APOE ϵ 4 and MAPT H1 in subjects with mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* 33:1009-1019.
- González-Escamilla G, Atienza M, Cantero JL (2015). Impaired cortical oscillatory coupling in mild cognitive impairment: anatomical substrate and ApoE4 effects. *Brain Struct Funct.* 220:1721-1737.
- Gorgoni M, Lauri G, Truglia I, Cordone S, Sarasso S, Scarpelli S, Mangiaruga A, D'Atri A, Tempesta D, Ferrara M, Marra C, Rossini P, De Gennaro L (2016). Parietal fast sleep spindle density decrease in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Neural Plast.* 2016:8376108.
- Goux WJ (2002). The conformations of filamentous and soluble tau associated with Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry.* 41:13798-13806.
- Gozal D, Daniel JM, Dohanich GP (2001). Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci.* 21:2442-2450.
- Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Younkin SG (2007). Association of low plasma A β 42/A β 40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 64:354-362.
- Graves L, Pack A, Abel T (2001). Sleep and memory: a molecular perspective. *Trends Neurosci.* 24:237-243.
- Greyer S, Schleicher A, Zilles K (1999) Areas 3a, 3b, and 1 of human primary somatosensory cortex. *NeuroImage.* 10:63-83.
- Guarnieri B, Sorbi S (2015). Sleep and cognitive decline: a strong bidirectional relationship. It is time for specific recommendations on routine assessment and the management of sleep disorders in patients with mild cognitive impairment and dementia. *Eur Neurol.* 74:43-48.
- Guglielmotto M, Giliberto L, Tamagno E, Tabaton M (2010). Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci.* 2:3.
- Guidi I, Galimberti D, Lonati S, Novembrino C, Bamonti F, Tiriticco M, Fenoglio C, Venturelli E, Baron P, Bresolin N, Scarpini E (2006). Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 27:262-269.
- Guo Z, Liu X, Hou H, Wei F, Chen X, Shen Y, Chen W (2016). 1 H-MRS asymmetry changes in the anterior and posterior cingulate gyrus in patients with mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Compr Psychiatry.* 69:179-185.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Munton RP (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10911-10916.
- Hahn EA, Wang HX, Andel R, Fratiglioni L (2014). A change in sleep pattern may predict Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry.* 22:1262-1271.
- Hakim F, Wang Y, Carreras A, Hirotsu C, Zhang J, Peris E, Gozal D (2015). Chronic sleep fragmentation during the sleep period induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and PTP1b-mediated leptin resistance in male mice. *Sleep.* 38:31-40.
- Hamm V, Heraud C, Cassel JC, Mathis C, Goutagny R (2015). Precocious alterations of brain oscillatory activity in Alzheimer's disease: A window of opportunity for early diagnosis and treatment. *Front Cell Neurosci.* 9:491.
- Haroutunian V, Perl DP, Purohit DP, Marin D, Khan K, Lantz M, Davis KL, Mohs RC (1998). Regional distribution of neuritic plaques in the nondemented elderly and subjects with very mild Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 55:1185-1195.
- Hartter DE, Barnea A (1988). Brain tissue accumulates copper by two ligand-dependent saturable processes. A high affinity, low capacity and a low affinity, high capacity process. *J Biol Chem.* 263:799-805.
- Hasselmo ME, Bower JM (1993). Acetylcholine and memory. *Trends Neurosci.* 16:218-222.
- Hasselmo ME, Sarter M (2011). Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology.* 36:52-73.

- Hatashita S, Wakebe D (2017). Amyloid- β Deposition and long-term progression in mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease defined with amyloid PET imaging. *J Alzheimers Dis.* 57:765-773.
- He Y, Chen Z, Evans A (2008). Structural insights into aberrant topological patterns of large-scale cortical networks in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 28:4756.
- He J, Hsueh H, He Y, Kastin AJ, Wang Y, Pan W (2014). Sleep restriction impairs blood-brain barrier function. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 34:14697-14706.
- Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3270-3274.
- Henstridge CM, Jackson RJ, Kim JM, Herrmann AG, Wright AK, Harris SE, Bastin ME, Starr JM, Wardlaw J, Gillingwater TH, Smith C, McKenzie CA, Cox SR, Deary IJ, Spires-Jones TL (2015). Post-mortem brain analyses of the lothian birth cohort 1936: extending lifetime cognitive and brain phenotyping to the level of the synapse. *Acta Neuropathol Commun.* 3:53.
- Herholz K, Salmon E, Perani D, Baron JC, Holthoff V, Frölich L, Schönknecht P, Ito K, Mielke R, Kalbe E, Zündorf G, Delbeuck X, Pelati O, Anchisi D, Fazio F, Kerrouche N, Desgranges B, Eustache F, Beuthien-Baumann B, Menzel C, Schröder J, Kato T, Arahata Y, Henze M, Heiss WD (2002). Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *Neuroimage.* 17:302-316.
- Herrmann W, Quast S, Ullrich M, Schultze H, Bodis M, Geisel J (1999). Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis.* 144:91-101.
- Hiltunen M, van Groen T, Jolkkonen J (2009). Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides: evidence from experimental studies. *J Alzheimers Dis.* 18:401-412.
- Hita-Yáñez E, Atienza M, Cantero JL (2013). Polysomnographic and subjective sleep markers of mild cognitive impairment. *Sleep.* 36:1327-1334.
- Hita-Yáñez E, Atienza M, Gil-Neciga E, Cantero JL (2012). Disturbed sleep patterns in elders with mild cognitive impairment: the role of memory decline and ApoE ϵ 4 genotype. *Curr Alzheimer Res.* 9:290-297.
- Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB (2001). Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem.* 78:249-253.
- Hobson JA (2002). The dream drugstore: Chemically altered states of consciousness. MIT Press.
- Hogervorst E, Ribeiro HM, Molyneux A, Budge M, Smith AD (2002). Plasma homocysteine levels, cerebrovascular risk factors, and cerebral white matter changes (leukoaraiosis) in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 59:787-793.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, Scheper W (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 110:165-172.
- Huang YL, Liu RY, Wang QS, Van Someren EJ, Xu H, Zhou JN (2002a). Age-associated difference in circadian sleep-wake and rest-activity rhythms. *Physiol Behav.* 76:597-603.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL (2002b). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem.* 50:4337-4344.
- Huang Y, Potter R, Sigurdson W, Santacruz A, Shih S, Ju YE, Kasten T, Morris JC, Mintun M, Duntley S, Bateman RJ (2012). Effects of age and amyloid deposition on $a\beta$ dynamics in the human central nervous system. *Arch Neurol.* 69:51.
- Hughes CP, Berg L, Danzler WL (1982). A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry.* 140:566-572.

- Hurtado-Alvarado G, Domínguez-Salazar E, Pavon L, Velázquez-Moctezuma J, Gómez-González B (2016). Blood-brain barrier disruption induced by chronic sleep loss: Low-grade inflammation may be the link. *J Immunol Res.* 2016:4576012.
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ (2012). National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 8:1-13.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR (1987). Alzheimer's disease: glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann Neurol.* 22:37-40.
- Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y (2004). Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:6623-6628.
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Trans Med.* 4:147ra111.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso ADC, Grundke-Iqbal I (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 118:53-69.
- Ishii K, Kawachi T, Sasaki H, Kono AK, Fukuda T, Kojima Y, Mori E (2005). Voxel-based morphometric comparison between early-and late-onset mild Alzheimer's disease and assessment of diagnostic performance of z score images. *AJNR Am J Neuroradiol.* 26:333-340.
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol.* 24:173-182.
- Izco M, Martínez P, Corrales A, Fandos N, García S, Insua D, Martínez-Cué C (2014). Changes in the brain and plasma A β peptide levels with age and its relationship with cognitive impairment in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 263:269-279.
- Jack CR Jr, Knopman DS, Chételat G, Dickson D, Fagan AM, Frisoni GB, Van Der Flier WM (2016). Suspected non-Alzheimer disease pathophysiology [mdash] concept and controversy. *Nat Rev Neurol.* 12:117-24
- Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Trojanowski, JQ (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 9:119-128.
- Jack CR, Petersen RC, Xu YC, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Kokmen E (1999). Prediction of AD with MRI-based hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Neurology.* 52:1397-1397.
- Jack CR, Wiste HJ, Lesnick TG, Weigand SD, Knopman DS, Vemuri P, Lowe VJ (2013). Brain β -amyloid load approaches a plateau. *Neurology.* 80:890-896.
- Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, Wright JD, Johnson CL (1999). Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr.* 69:482-489.
- Jakubowski H (2014). Homocysteine in protein structure/function and human disease. Springer; pp. 121-135.
- Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, Zetterberg H, Van Westen D, Jeromin A, Blennow K (2016). Plasma β -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep.* 6:26801
- Jara-Prado A, Ortega-Vazquez A, Ruano LM, Rios C, Santamaria A (2003). Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. *Neurotox Res.* 5:237-243.
- Jasper HH (1958). Report of the committee on methods of clinical examination in electroencephalography. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 10:370-371.
- Jessen F, Feyen L, Freymann K, Tepest R, Maier W, Heun R, Scheef L (2006). Volume reduction of the entorhinal cortex in subjective memory impairment. *Neurobiol Aging.* 27:1751-1756.

- Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M (2015). The glymphatic system: a beginner's guide. *Neurochem Res.* 40:2583-2599.
- Jiménez-Jiménez FJ, de Bustos F, Molina JA, Benito-León J, Tallón-Barranco A, Gasalla T, Ortí-Pareja M, Guillamón F, Rubio JC, Arenas J, Enríquez-de-Salamanca R (1997). Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 104:703-710.
- Joachim CL, Mori H, Selkoe DJ (1989). Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature.* 341:226-230.
- Johar H, Kawan R, Emeny RT, Ladwig KH (2016). Impaired sleep predicts cognitive decline in old people: findings from the prospective KORA age study. *Sleep.* 39:217-226.
- Joo EY, Kim H, Suh S, Hong SB (2014). Hippocampal substructural vulnerability to sleep disturbance and cognitive impairment in patients with chronic primary insomnia: magnetic resonance imaging morphometry. *Sleep.* 37:1189-1198.
- Ju YES, Lucey BP, Holtzman DM (2014). Sleep and Alzheimer disease pathology a bidirectional relationship. *Nat Rev Neurol.* 10:115-119.
- Ju YES, McLeland JS, Toedebusch CD, Xiong C, Fagan AM, Duntley SP, Morris JC, Holtzman DM (2013). Sleep quality and preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 70:587-593.
- Kaffashian S, Tzourio C, Soumaré A, Dufouil C, Mazoyer B, Schraen-Maschke S (2015). Association of plasma β -amyloid with MRI markers of structural brain aging the 3-City Dijon study. *Neurobiol Aging.* 36:2663-2670.
- Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, Holtzman DM (2009). Amyloid- β dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science.* 326:1005-1007.
- Kang D, Lim HK, Jung WS, Jeong JH, Kim TW, Han JH, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX, Antuono P, World Federation of Neurology Dementia Research Group (2015). Sleep and Alzheimer's disease. *Sleep Med Res.* 6:1-9.
- Kantarci K, Xu Y, Shiung MM, O'Brien PC, Cha RH, Smith GE, Tangalos EG (2002). Comparative diagnostic utility of different MR modalities in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 14:198-207.
- Kao SC, Krichevsky AM, Kosik KS, Tsai LH (2004). BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem.* 279:1942-1949.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001). Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21:372-381.
- Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A (2000). Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: The Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology.* 54:2072-2077.
- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR (2005). Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology.* 64:1152-1156.
- Keskitalo S, Farkas M, Hanenberg M, Szodorai A, Kulic L, Semmler A, Weller M, Nitsch RM, Linnebank M (2014). Reciprocal modulation of A β 42 aggregation by copper and homocysteine. *Front Aging Neurosci.* 6:237.
- Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M, Pourmotabbed T (2008). Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem.* 41:932-936.
- Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1992). Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem.* 59:750-753.
- Killgore WD, Schwab ZJ, Kipman M, DelDonno SR, Weber M (2012). Voxel-based morphometric gray matter correlates of daytime sleepiness. *Neurosci Lett.* 518:10-13.

- Kim SR, Choi SH, Ha CK, Park SG, Pyun HW, Yoon DH (2009). Plasma total homocysteine levels are not associated with medial temporal lobe atrophy, but with white matter changes in Alzheimer's disease. *J Clin Neurol.* 5:85-90.
- Kittelberger KA, Piazza F, Tesco G, Reijmers LG (2012). Natural amyloid-beta oligomers acutely impair the formation of a contextual fear memory in mice. *PLoS One.* 7:e29940.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Långström B (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 55:306-319.
- Koh K, Evans JM, Hendricks JC, Sehgal A (2006). A Drosophila model for age-associated changes in sleep:wake cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13843-13847.
- Koivunen J, Scheinin N, Virta JR, Aalto S, Vahlberg T, Nagren K, Helin S, Parkkola R, Viitanen M, Rinne JO (2011). Amyloid PET imaging in patients with mild cognitive impairment: A 2-year follow-up study. *Neurology.* 76:1085-1090.
- Koz ST, Etem EO, Baydas G, Yuçe H, Ozercan HI, Kuloğlu T, Koz S, Etem A, Demir N (2010). Effects of resveratrol on blood homocysteine level, on homocysteine induced oxidative stress, apoptosis and cognitive dysfunctions in rats. *Brain Res.* 12:29-38.
- Kulkarni K, Richard BC (2003). Lifestyle, homocysteine, and the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 1:141-147.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, Grenier-Boley B (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 45:1452-1458.
- Landgraf D, McCarthy M, Welsh DK (2014). Circadian clock and stress interactions in the molecular biology of psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 16:1-11.
- Lanzrein AS, Johnston CM, Perry VH, Jobst KA, King EM, Smith AD (1998). Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor- alpha, the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and alpha1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 12:215-227.
- Larson ME, Lesné SE (2012). Soluble A β oligomer production and toxicity. *J Neurochem.* 1:125-139.
- Lee G, Cowan N, Kirschner M (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science.* 239:285-288.
- Lee RK, Wurtman RJ, Cox AJ, Nitsch RM (1995). Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8083-8087.
- Leech R, Sharp DJ (2014). The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease. *Brain.* 137:12-32.
- Lehmann M, Rohrer JD, Clarkson MJ, Ridgway GR, Scahill RI, Modat M, Warren JD, Ourselin S, Barnes J, Rossor MN, Fox NC (2010). Reduced cortical thickness in the posterior cingulate gyrus is characteristic of both typical and atypical Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20:587-598.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 440:352-357.
- Li JG, Praticò D (2015). High levels of homocysteine results in cerebral amyloid angiopathy in mice. *J Alzheimers Dis.* 43:29-35.
- Li L, Zhang X, Yang D, Luo G, Chen S, Le W (2009). Hypoxia increases A β generation by altering beta- and gamma-cleavage of APP. *Neurobiol Aging.* 30:1091-1098.
- Liang F, Jia J, Wang S, Qin W, Liu G (2013). Decreased plasma levels of soluble low density lipoprotein receptor-related protein-1 (sLRP) and the soluble form of the receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci.* 20:357-361.

- Liguori C, Nuccetelli M, Izzi F, Sancesario G, Romigi A, Martorana A, Amoroso C, Bernardini S, Marciani M, Mercuri NB, Placidi F (2016). Rapid eye movement sleep disruption and sleep fragmentation are associated with increased orexin-A cerebrospinal-fluid levels in mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 40:120-126.
- Liguori C, Romigi A, Nuccetelli M, Zannino S, Sancesario G, Martorana A, Nitti, A (2014). Orexinergic system dysregulation, sleep impairment, and cognitive decline in Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 71:1498-1505.
- Lim AS, Kowgier M, Yu L, Buchman AS, Bennett DA (2013). Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's disease and cognitive decline in older persons. *Sleep*. 36:1027-1032.
- Lin MT, Beal MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 443:787-795.
- Linnebank M, Lutz H, Jarre E, Vielhaber S, Noelker C, Struys E, Jakobs C, Klockgether T, Evert BO, Kunz WS, Wüllner U (2006). Binding of copper is a mechanism of homocysteine toxicity leading to COX deficiency and apoptosis in primary neurons, PC12 and SHSY-5Y cells. *Neurobiol Dis*. 23:725-730.
- Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G (2013a). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat Rev Neurol*. 9:106-118.
- Liu H, Qiu H, Yang J, Ni J, Le W (2016). Chronic hypoxia facilitates Alzheimer's disease through demethylation of γ -secretase by downregulating DNA methyltransferase 3b. *Alzheimers Dement*. 12:130-143.
- Liu H, Tung-Sheng Shih, Hsin-Ru Huang, Shih-Chien Huang, Lien-Hsiung Lee, and Yi-Chia Huang (2013b). Plasma homocysteine is associated with increased oxidative stress and antioxidant enzyme activity in welders. *ScientificWorldJournal*. 2013:370487.
- Lladó-Saz S, Atienza M, Cantero JL (2015). Increased levels of plasma amyloid-beta are related to cortical thinning and cognitive decline in cognitively normal elderly subjects. *Neurobiol Aging*. 36:2791-2797.
- Lobo A, Escobar V, Ezquerro J, Seva Díaz A (1980). "El Mini-Examen Cognoscitivo"(Un test sencillo, práctico, para detectar alteraciones intelectuales en pacientes psiquiátricos). *Rev Psiquiat Psicol Med*. 14:39-57.
- Loewenstein RJ, Weingartner H, Gillin JC, Kaye W, Ebert M, Mendelson WB (1982). Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia. *Neurobiol Aging*. 3:371-377.
- London ED, Ball MJ, Waller SB (1989). Nicotinic binding sites in cerebral cortex and hippocampus in Alzheimer's dementia. *Neurochem Res*. 14:745-750.
- López OL, Kuller LH, Mehta PD, Becker JT, Gach HM, Sweet RA, DeKosky ST (2008). Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. *Neurology*. 70:1664-1671.
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*. 45:1594-1601.
- Lovell MA, Markesbery WR (2008). Oxidatively modified RNA in mild cognitive impairment. *Neurobiol Dis*. 29:169-175.
- Lovell MA, Xiong S, Xie C, Davies P, Markesbery WR (2004). Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J Alzheimers Dis*. 6:659-671.
- Lowe VJ, Curran G, Fang P, Liesinger AM, Josephs KA, Parisi JE, Knopman DS (2016). An autoradiographic evaluation of AV-1451 Tau PET in dementia. *Acta Neuropathol Commun*. 4:58.
- Lucey BP, Bateman RJ (2014). Amyloid- β diurnal pattern: possible role of sleep in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging*. 35:S29-S34.
- Lui JK, Laws SM, Li QX, Villemagne VL, Ames D, Brown B, Faux NG (2010). Plasma amyloid- β as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis*. 20:1233-1242.

- Lukiw WJ, & Bazan NG (2008). Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr.* 138:2510-2514.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 68:2061-2069.
- Ma F, Wu T, Zhao J, Song A, Liu H, Xu W, Huang G (2016). Folic acid supplementation improves cognitive function by reducing the levels of peripheral inflammatory cytokines in elderly Chinese subjects with MCI. *Sci Rep.* 23:37486.
- MacKinnon DP, Fairchild AJ, Fritz MS (2007). Mediation analysis. *Annu Rev Psychol.* 58:593-614.
- Maddock RJ, Garrett AS, Buonocore MH (2001). Remembering familiar people: the posterior cingulate cortex and autobiographical memory retrieval. *Neuroscience.* 104:667-676.
- Madsen SK, Rajagopalan P, Joshi SH, Toga AW, Thompson PM (2015). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). Higher homocysteine associated with thinner cortical gray matter in 803 participants from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Neurobiol Aging.* 36:S203-S210.
- Mäkelä KA, Wigren HK, Zant JC, Sakurai T, Alhonen L, Kostin A, Porkka-Heiskanen T, Herzig KH (2010). Characterization of sleep-wake patterns in a novel transgenic mouse line overexpressing human prepro-orexin/hypocretin. *Acta Physiol.* 198:237-249.
- Malhotra JD, Kaufman RJ (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 9:2277-2294.
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006). Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet.* 15:1437-1449.
- Mander BA, Rao V, Lu B, Saletin JM, Lindquist JR, Ancoli-Israel S, Jagust W, Walker MP (2013). Prefrontal atrophy, disrupted NREM slow waves and impaired hippocampal-dependent memory in aging. *Nat Neurosci.* 16:357-364.
- Mao P, Reddy PH (2011). Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. *Biochim Biophys Acta.* 1812:1359-1370.
- Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 150:40-44.
- Marksbery WR, Lovell MA (1998). Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 19:33-36.
- Martins P, D'Almeida V, Vergani N, Perez A, Tufik S (2003). Increased plasma homocysteine levels in shift working bus drivers. *Occup Environ Med.* 60: 662-666.
- Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL (2015). Alzheimer's disease. Nature Publishing Group London; pp.1-18.
- Mathangi DCP, Shyamala R, Subhashini AS (2012). Effect of REM sleep deprivation on the antioxidant status in the brain of Wistar rats. *Ann Neurosci.* 19:161-164.
- Mattsson N, Zegers I, Andreasson U, Bjerke M, Blankenstein MA, Bowser R, Carrillo MC, Gobom J, Heath T, Jenkins R, Jeromin A, Kaplow J, Kidd D, Laterza OF, Lockhart A, Lunn MP, Martone RL, Mills K, Pannee J, Ratcliffe M, Shaw LM, Simon AJ, Soares H, Teunissen CE, Verbeek MM, Umek RM, Vanderstichele H, Zetterberg H, Blennow K, Portelius E (2012). Reference measurement procedures for Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers: definitions and approaches with focus on amyloid β 42. *Biomark Med.* 6:409-417.
- Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003). Plasma A β 40 and A β 42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology.* 61:1185-1190.
- McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H (1998). Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int J Geriatr Psychiatry.* 13:235-239.
- McCord JM, Fridovich I (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 243:5753-5760.

- McCord JM, Keele BB, Fridovich I (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68:1024-1027.
- McCully KS (2016). Homocysteine, infections, polyamines, oxidative metabolism, and the pathogenesis of dementia and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis*. 54:1283-1290.
- McDonald B, Highley JR, Walker MA, Herron BM, Cooper SJ, Esiri MM, Crow TJ (2000). Anomalous asymmetry of fusiform and parahippocampal gyrus gray matter in schizophrenia: A postmortem study. *Am J Psychiatry*. 157:40-47.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guide-lines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 7:263-269.
- Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM (2000). Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid β proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 57:100-105.
- Menéndez-González M (2014). Routine lumbar puncture for the early diagnosis of Alzheimer's disease. Is it safe? *Front Aging Neurosci*. 6:65.
- Mesulam M (2004). The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem*. 11:43-49.
- Mikulca JA, Nguyen V, Gajdosik DA, Teklu SG, Giunta EA, Lessa EA, Tran CH, Terak EC, Raffa RB (2014). Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II Update on secretase inhibitors and related approaches. *J Clin Pharm Ther*. 39:25-37.
- Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE (1997). Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 42:85-94.
- Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, Yagita Y, Sakaguchi M, Mochizuki H, Kitagawa K (2016). Increased total homocysteine levels predict the risk of incident dementia independent of cerebral small-vessel diseases and vascular risk factors. *J Alzheimers Dis*. 49:503-513.
- Moe KE, Vitiello MV, Larsen LH, Prinz PN (1995). Sleep/wake patterns in Alzheimer's disease: relationships with cognition and function. *J Sleep Res*. 4:15-20.
- Monk TH, Kupfer DJ (2000). Circadian rhythms in healthy aging effects downstream from the pacemaker. *Chronobiol Int*. 17:355-368.
- Moran M, Lynch CA, Walsh C, Coen R, Coakley D, Lawlor BA (2005). Sleep disturbance in mild to moderate Alzheimer's disease. *Sleep Med*. 6:347-352.
- Morbelli S, Piccardo A, Villavecchia G, Dessi B, Brugnolo A, Piccini A, Caroli A, Frisoni G, Rodriguez G, Nobili F (2010). Mapping brain morphological and functional conversion patterns in amnesic MCI: a voxel-based MRI and FDG-PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 37:36-45.
- Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry, G (2010). Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 1802:2-10.
- Morgan K (2011). The three new pathways leading to Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 37:353-357.
- Morrell MJ, Twigg G (2006). Neural consequences of sleep disordered breathing: the role of intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 588:75-88.
- Mosconi L, Pupi A, De Cristofaro MTR, Fayyaz M, Sorbi S, Herholz K, Herholz K (2004). Functional interactions of the entorhinal cortex: an 18F-FDG PET study on normal aging and Alzheimer's disease. *J Nucl Med*. 45:382-392.
- Mosconi L, Tsui WH, De Santi S, Li J, Rusinek H, Convit A, De Leon MJ (2005). Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD Automated FDG-PET image analysis. *Neurology*. 64:1860-1867.
- Moslemnezhad A, Mahjoub S, Moghadasi M (2016). Altered plasma marker of oxidative DNA damage and total antioxidant capacity in patients with Alzheimer's disease. *Caspian J Inter Med*. 7:88-92.

- Motter N, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Olson D (1995). Reduction of β -amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 38:643-648.
- Mufson EJ, Chen EY, Cochran EJ, Beckett LA, Bennett DA, Kordower JH (1999). Entorhinal cortex β -amyloid load in individuals with mild cognitive impairment. *Exp Neurol.* 158:469-490.
- Murakami K, Irie K, Ohigashi H, Hara H, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T (2005). Formation and stabilization model of the 42-mer A β radical: implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Am Chem Soc.* 127:15168-15174.
- Murphy M, Riedner BA, Huber R, Massimini M, Ferrarelli F, Tononi G (2009). Source modeling sleep slow waves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:1608-1613.
- Musiek ES, Xiong DD, Holtzman DM (2015). Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Exp Mol Med.* 47:e148.
- Naidoo N (2009). Cellular stress/the unfolded protein response: relevance to sleep and sleep disorders. *Sleep Med Rev.* 13:195-204.
- Naidoo N, Ferber M, Master M, Zhu Y, Pack AI (2008). Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *J Neurosci.* 28:6539-6548.
- Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD (2000). Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 283:1571-1577.
- Nestor PJ, Fryer TD, Smielewski P, Hodges JR (2003). Limbic hypometabolism in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol.* 54:343-351
- Nilsson L, Nordberg A, Hardy JA, Wester P, Winblad B (1986). Physostigmine restores [3H]-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *J Neural Transm.* 67:275-285.
- Nitsch RM, Deng A, Wurtman RJ, Growdon JH (1997). Metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 α stimulates the secretion of the amyloid β -Protein precursor ectodomain. *J Neurochem.* 69:704-712.
- O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, Huebinger R, Wilhelmsen K, Edwards M, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2011). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. A blood-based screening tool for Alzheimer's disease that spans serum and plasma: findings from TARC and ADNI. *PLoS One.* 6:e28092.
- O'Brien RJ, Wong PC (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 34:185-204.
- Obeid R, Herrmann W (2006). Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* 580:2994-3005.
- Obeid R, Schorr H, Eckert R, Herrmann W (2004). Vitamin B12 status in the elderly as judged by available biochemical markers. *Clin Chem.* 50:238-241.
- Olney JW, Wozniak DF, Farber NB (1997). Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease: new hypothesis and new therapeutic strategies. *Arch Neurol.* 54:1234-1240.
- Ong KT, Villemagne VL, Bahar-Fuchs A, Lamb F, Langdon N, Catafau AM, Stephens AW, Seibyl J, Dinkelborg LM, Reiningner CB, Putz B, Rohde B, Masters CL, Rowe CC (2015). A β imaging with 18F-florbetaben in prodromal Alzheimer's disease: a prospective outcome study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 86:431-436.
- Ooms S, Overeem S, Besse K, Rikkert MO, Verbeek M, Claassen JA (2014). Effect of 1 night of total sleep deprivation on cerebrospinal fluid β -amyloid 42 in healthy middle-aged men: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol.* 71:971-977.
- Osorio RS, Gumb T, Pirraglia E, Varga AW, Lu SE, Lim, Wohlleber ME, Ducca EL, Koushyk V, Glodzik L, Mosconi L, Ayappa I, Rapoport DM, de Leon MJ, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015). Sleep-disordered breathing advances cognitive decline in the elderly. *Neurology.* 84:1964-1971.

- Osorio RS, Pirraglia E, Agüera-Ortiz LF, During EH, Sacks H, Ayappa I, Walsleben J, Mooney A, Hussain A, Glodzik L, Frangione B, Martínez-Martín P, de Leon MJ (2011). Greater risk of Alzheimer's disease in older adults with insomnia. *J Am Geriatr Soc.* 59:559-562.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 49:4619-4626.
- Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC (1999). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood.* 94:959-967.
- Pacheco-Quinto J, Rodriguez de Turco EB, DeRosa S, Howard A, Cruz-Sanchez F, Sambamurti K, Refolo L, Petanceska S, Pappolla MA (2006). Hyperhomocysteinemic Alzheimer's mouse model of amyloidosis shows increased brain amyloid beta peptide levels. *Neurobiol Dis.* 22:651-666.
- Pacifici RE, Davies KJ (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology.* 37:166-180.
- Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C (2010). Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 469:6-10.
- Pagani M, De Carli F, Morbelli S, Öberg J, Chincarini A, Frisoni GB, Galluzzi S, Pernecky R, Drzezga A, van Berckel BN, Ossenkuppele R, Didic M, Guedj E, Brugnolo A, Picco A, Arnaldi D, Ferrara M, Buschiazzo A, Sambuceti G, Nobili F, (2014). Volume of interest-based [¹⁸F] fluorodeoxyglucose PET discriminates MCI converting to Alzheimer's disease from healthy controls. A European Alzheimer's Disease Consortium (EADC) study. *NeuroImage Clin.* 7:34-42.
- Palmqvist S, Mattsson N, Hansson O, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid- β accumulation earlier than positron emission tomography. *Brain.* 139:1226-1236.
- Park JC, Han SH, Cho HJ, Byun MS, Yi D, Choe YM, Kang S, Jung ES, Won SJ, Kim EH, Kim YK, Lee DY, Mook-Jung I (2017). Chemically treated plasma A β is a potential blood-based biomarker for screening cerebral amyloid deposition. *Alzheimers Res Ther.* 9:20.
- Pavlova MK, Duffy JF, Shea SA (2008). Polysomnographic respiratory abnormalities in asymptomatic individuals. *Sleep.* 31:241-248.
- Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJ, Machado RB, Ling L, Nishino S, Tufik S, Mignot E (2004). Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Res.* 995:1-6.
- Peña-Casanova J, Quiñones-Úbeda S, Gramunt-Fombuena N, Aguilar M, Casas L, Molinuevo JL, Robles A, Rodríguez D, Barquero MS, Antúnez C, Martínez-Parra C, Frank-García A, Fernández M, Molano A, Alfonso V, Sol JM, Blesa R; NEURONORMA Study Team (2009a). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for Boston naming test and token test. *Arch Clin Neuropsychol.* 24:343-354.
- Peña-Casanova J, Quiñones-Úbeda S, Quintana-Aparicio, Aguilar M, Badenes D, Molinuevo JL, Torner L, Robles A, Barquero MS, Villanueva C, Antúnez C, Martínez-Parra C, Frank-García A, Sanz A, Fernández M, Alfonso V, Sol JM, Blesa R; NEURONORMA Study Team (2009b). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for verbal span, visuospatial span, letter and number sequencing, trail making test, and symbol digit modalities test. *Arch Clin Neuropsychol.* 24:321-341.
- Peña-Casanova J, Gramunt-Fombuena N, Quiñones-Úbeda S, Sánchez-Benavides G, Aguilar M, Badenes D, Molinuevo JL, Robles A, Barquero MS, Payno M, Antúnez C, Martínez-Parra C, Frank-García A, Fernández M, Alfonso V, Sol JM, Blesa R; NEURONORMA Study Team (2009c). Spanish Multicenter Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for the rey-osterrieth complex figure (copy and memory), and free and cued selective reminding test. *Arch Clin Neuropsychol.* 24:371-393.
- Peña-Casanova J, Quintana-Aparicio M, Quiñones-Úbeda S, Aguilar M, Molinuevo JL, Serradell M, Robles A, Barquero MS, Villanueva C, Antúnez C, Martínez-Parra C, Frank-García A, Aguilar MD, Fernández M, Alfonso V, Sol JM, Blesa R; NEURONORMA Study Team (2009d). Spanish Multicenter

- Normative Studies (NEURONORMA Project): Norms for the visual object and space perception battery-abbreviated, and judgment of line orientation. *Arch Clin Neuropsychol*. 24:355-370.
- Perrotin A, Mormino EC, Madison CM, Hayenga AO, Jagust WJ (2012). Subjective cognition and amyloid deposition imaging: a Pittsburgh Compound B positron emission tomography study in normal elderly individuals. *Arch Neurol*. 69:223-229.
- Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez, A (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxi Med Cell Longev*. 2014:427318.
- Pesaresi M, Lovati C, Bertora P, Mailland E, Galimberti D, Scarpini E, Mariani C (2006). Plasma levels of beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 27:904-905.
- Petersen PR, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999). Mild cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 56:303-308.
- Petit D, Lorrain D, Gauthier S, Montplaisir J (1993). Regional Spectral Analysis of the REM Sleep EEG in Mild to Moderate Alzheimer's diseases. *Neurobiol Aging*. 14:141-145.
- Peyron C, Tighe DK, Van Den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 18:9996-10015.
- Phillips B, Young T, Finn L, Asher K, Hening WA, Purvis C (2000). Epidemiology of restless legs symptoms in adults. *Arch Intern Med*. 160:2137-2141.
- Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, Mathis CA, Klunk WE, Masters CL, Rowe CC (2007). Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain*. 130:2837-2844.
- Poljak A, Crawford JD, Smythe GA, Brodaty H, Slavin MJ, Kochan NA (2016). The relationship between plasma $\alpha\beta$ levels, cognitive function and brain volumetrics: sydney memory and ageing study. *Curr Alzheimer Res*. 13:243-255.
- Pollak CP, Perlick D (1991). Sleep problems and institutionalization of the elderly. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 4:204-210.
- Polotsky VY, Rubin AE, Balbir A, Dean T, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP (2006). Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse. *Sleep Med*. 7:7-16.
- Praticò D, Clark CM, Liun F, Lee VYM, Trojanowski JQ (2002). Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 59:972-976.
- Prieto Del Val L, Cantero JL, Atienza M (2016). Atrophy of amygdala and abnormal memory-related alpha oscillations over posterior cingulate predict conversion to Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 6:31859.
- Prinz PN, Peskind ER, Vitaliano PP, Raskind MA, Eisdorfer C, Zemcuznikov N, Gerber CJ (1982). Changes in the sleep and waking EEGs of nondemented and demented elderly subjects. *J Am Geriatr Soc*. 30:86-93.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem*. 51:3273-3279.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 53:4290-4302.
- Pulido R, Jiménez-Escrig A, Orensanz L, Saura-Calixto F, Jiménez-Escrig A (2005). Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 12:531-535.
- Rajagopalan P, Hua X, Toga AW, Jack CR, Weiner MW, Thompson PM (2011). Homocysteine effects on brain volumes mapped in 732 elderly individuals. *Neuroreport*. 22:391-395.
- Rajendiran S, Kumari S, Nimesh A (2015). Markers of oxidative stress in pregnant women with sleep disturbances. *Oman Med J*. 30:264-269.
- Rajendran L, Annaert W (2012). Membrane trafficking pathways in Alzheimer's Disease. *Traffic*. 13:759-770.

- Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM (2002). Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. *Neuroreport*. 13:1387-1390.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, Porcellini E, Licastro F (2005). Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 82:636-643.
- Rechtschaffen A, Kales A (1968). A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. UCLA Brain Information Service/Brain Research Institute, Los Angeles, California.
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM (2004). Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical Chem*. 50:3-32.
- Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 348:1333-1341.
- Repetto MG, Reides CG, Evelson P, Kohan S, de Lustig ES, Llesuy SF (1999). Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur J Clin Invest*. 29:643-649.
- Rice-Evans CA, Miller NJ (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*. 24:790-795.
- Riemann D, Voderholzer U, Spiegelhalder K, Hornyak M, Buysse DJ, Nissen C, Hennig J, Perlis ML, van Elst LT, Feige B (2007). Chronic insomnia and MRI-measured hippocampal volumes: a pilot study. *Sleep*. 30:955-958.
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P (2003). Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24:915-919.
- Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Gylys KH, Varpetian A, Medina LD, Cummings JL (2008). Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology*. 71:85-92.
- Risacher SL, Saykin AJ, West JD, McDonald BC; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) (2009). Baseline MRI predictors of conversion from MCI to probable AD in the ADNI cohort. *Curr Alzheimer Res*. 6:347-361.
- Rocher AB, Chapon F, Blaizot X, Baron JC, Chavoix C (2003). Resting-state brain glucose utilization as measured by PET is directly related to regional synaptophysin levels: A study in baboons. *Neuroimage*. 20:1894-1898.
- Roh JH, Holtzman DM (2015). Is there a link between the sleep-wake cycle and Alzheimer's pathology? *Neurodegener Dis Manag*. 4:351-362.
- Roh JH, Huang Y, Bero AW, Kasten T, Stewart FR, Bateman RJ, Holtzman DM (2012). Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of β -amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. *Sci Trans Med*. 4:150ra122.
- Roh JH, Jiang H, Finn MB, Stewart FR, Mahan TE, Cirrito JR, Heda A, Snider BJ, Li M, Yanagisawa M, de Lecea L, Holtzman DM (2014). Potential role of orexin and sleep modulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 21:2487-2496.
- Rombouts SA, Barkhof F, Goekoop R, Stam CJ, Scheltens P (2005). Altered resting state networks in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease: an fMRI study. *Hum Brain Mapp*. 26:231-239.
- Ron D, Walter P (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:519-529.
- Rosenblum WI (2014). Why Alzheimer trials fail: removing soluble oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult. *Neurobiol Aging*. 35:969-974.
- Rowe CC, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, Smith C, Cowie TF, Dickinson KL, Maruff P, Darby D, Smith C, Woodward M, Merory J, Tochon-Danguy H, O'Keefe G, Klunk WE, Mathis CA, Price JC,

- Masters CL, Villemagne VL (2007). Imaging β -amyloid burden in aging and dementia. *Neurology*. 68:1718-1725.
- Rylett RJ, Ball MJ, Colhuon EH (1983). Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res*. 289:169-175.
- Sabri O, Sabbagh MN, Seibyl J, Barthel H, Akatsu H, Ouchi Y, Beach TG (2015). Florbetaben phase 3 study group florbetaben PET imaging to detect amyloid beta plaques in Alzheimer's disease: phase 3 study. *Alzheimers Dement*. 11:964-974.
- Sachdev P (2004). Homocysteine, cerebrovascular disease and brain atrophy. *J Neurol Sci*. 226:25-29.
- Sachdev PS (2005). Homocysteine and brain atrophy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29:1152-1161.
- Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Goate A (2007). Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med*. 13:1029-1031.
- Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H (2002). Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem*. 277:12915-12920.
- Saido T, Leissring MA (2012). Proteolytic degradation of amyloid β -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2:a006379.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 92:573-585.
- Sánchez-Espinosa MP, Atienza M, Cantero JL (2014). Sleep deficits in mild cognitive impairment are related to increased levels of plasma amyloid- β and cortical thinning. *NeuroImage*. 98:395-404.
- Sánchez-Espinosa MP, Atienza M, Cantero JL (en revisión). Sleep mediates the association between homocysteine and oxidative status in mild cognitive impairment.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 437:1257-1263.
- Sasaki H, Muramoto O, Kanazawa I, Arai H, Kosaka K, Iizuka R (1986). Regional distribution of amino acid transmitters in postmortem brains of presenile and senile dementia of Alzheimer type. *Ann Neurol*. 19:263-269.
- Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, Bernier F, Aoshima K, Oda Y (2012). Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *J Lipid Res*. 53:567-576.
- Scheperjans F, Eickhoff SB, Hömke H, Mohlberg K, Hermann K, Amunts K, Zilles K (2008). Probabilistic maps, morphometry, and variability of citoarchitectonic areas in the human superior parietal cortex. *Cereb Cortex*. 18:2141-2157.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2:864-870.
- Schmitz TW, Nathan Spreng, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). Basal forebrain degeneration precedes and predicts the cortical spread of Alzheimer's pathology. *Nat Commun*. 4:13249.
- Schöll M, Lockhart SN, Schonhaut DR, O'Neil JP, Janabi M, Ossenkoppele R, Baker SL, Vogel JW, Faria J, Schwimmer HD, Rabinovici GD, Jagust WJ (2016). PET imaging of tau deposition in the aging human brain. *Neuron*. 89:971-982.

- Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, Squitti R, Perry G (2013). Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis.* 59:100-110.
- Schupf N, Patel B, Pang D, Zigman WB, Silverman W, Mehta PD, Mayeux R (2007). Elevated plasma beta-amyloid peptide A β (42) levels, incident dementia and mortality in Down syndrome. *Arch Neurol.* 64:1007-1013.
- Schupf N, Tang MX, Fukuyama H, Manly J, Andrews H, Mehta P (2008). Peripheral A β subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:14052-14057.
- Segonne F, Dale AM, Busa E, Glessner M, Salat D, Hahn HK, Fischl B (2004). A hybrid approach to the skull stripping problem in MRI. *NeuroImage.* 22:1060-1075.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 8:595-608.
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf, T (1988). Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110-to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:7341-7345.
- Serra JA, Dominguez RO, De Lustig ES, Guareschi EM, Famulari A, Bartolome EL, Marschoff ER (2001). Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *J Neural Transm.* 108:1135-1148.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1:a006189.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wolf PA (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 346:476-483.
- Shan L, Dauvilliers Y, Siegel JM (2015). Interactions of the histamine and hypocretin systems in CNS disorders. *Nat Rev Neurol.* 11:401-413.
- Sharma M, Tiwari M, Tiwari RK (2015). Hyperhomocysteinemia: impact on neurodegenerative diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 117:287-296.
- Sheng M, Kim MJ (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science.* 298:776-780.
- Sherrington R, Rogaev Ei, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375:754-760.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 106:1489-1499.
- Shimohama S, Taniguchi T, Fujiwara M, Kameyama M (1986). Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem.* 46:288-293.
- Shiota S, Takekawa H, Matsumoto SE, Takeda K, Nurwidya F, Yoshioka Y, Takahashi F, Hattori N, Tabira T, Mochizuki H, Takahashi K (2013). Chronic intermittent hypoxia/reoxygenation facilitate amyloid- β generation in mice. *J Alzheimers Dis.* 37:325-333.
- Silva RH, Abilio VC, Takatsu AL, Kameda SR, Grassl C, Chehin AB, Medrano WA, Calzavara MB, Registro S, Andersen ML, Machado RB, Carvalho RC, Ribeiro Rde A, Tufik S, Frussa-Filho R (2004). Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology.* 46:895-903.
- Singh R, Kiloung J, Singh S, Sharma D (2008). Effect of paradoxical sleep deprivation on oxidative stress parameters in brain regions of adult and old rats. *Biogerontology.* 9:153-162.
- Singh I, Sagare AP, Coma M, Perlmutter D, Gelein R, Bell RD, Deane RJ, Zhong E, Parisi M, Ciszewski J, Kasper RT, Deane R (2013). Low levels of copper disrupt brain amyloid- β homeostasis by altering its production and clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:14771-14776.
- Slats D, Claassen JA, Lammers GJ, Melis RJ, Verbeek MM, Overeem S (2012). Association between hypocretin-1 and amyloid- β 42 cerebrospinal fluid levels in Alzheimer's disease and healthy controls. *Curr Alzheimer Res.* 9:1119-1125.

- Smith AD, Smith SM, De Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G, Oulhaj A, Bradley KM, Jacoby R, Refsum H (2010). Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One*. 5:e12244.
- Sobel ME (1982). Asymptotic confidence intervals for indirect effects in structural equation models. In S Leinhardt (Ed.), *Sociological Methodology*; pp. 290-312.
- Sobów T, Flirski M, Kłoszewska I, Liberski PP (2005). Plasma levels of alpha beta peptides are altered in amnesic mild cognitive impairment but not in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp*. 65:117-124.
- Solfrizzi V, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, P Imbimbo B, D'Onofrio G, Panza, F (2011). Mediterranean diet in predementia and dementia syndromes. *Curr Alzheimer Res*. 8:520-542.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, Diaz-Arrastia R, Ogris E, Dayal S, Lentz SR, Arning E, Bottiglieri T (2007). Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. *J Neurosci*. 27:2751-2759.
- Sotolongo-Grau O, Pesini P, Valero S, Lafuente A, Buendía M, Pérez-Grijalba V, José IS, Ibarria M, Tejero MA, Giménez J, Hernández I, Tárraga L, Ruiz A, Boada M, Sarasa M (2014). Association between cell-bound blood amyloid- β (1-40) levels and hippocampus volume. *Alzheimers Res Ther*. 6:56.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Park DC (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 7:280-292.
- Sperling RA, Karlawish J, Johnson KA (2013). Preclinical Alzheimer disease-the challenges ahead. *Nat Rev Neurol*. 9:54-58.
- Spies PE, Verbeek MM, van Groen T, Claassen JA (2012). Reviewing reasons for the decreased CSF A β 2 concentration in Alzheimer disease. *Front Biosci*. 1:2024-2034.
- Spira AP, Gamaldo AA, An Y, Wu MN, Simonsick EM, Bilgel M, Zhou Y, Wong DF, Ferrucci L, Resnick SM (2013). Self-reported sleep and β -amyloid deposition in community-dwelling older adults. *JAMA Neurol*. 70:1537-1543.
- Sprecher KE, Bendlin BB, Racine AM, Okonkwo OC, Christian BT, Kosciak RL, Sager MA, Asthana S, Johnson SC, Benca RM (2015). Amyloid burden is associated with self-reported sleep in nondemented late middle-aged adults. *Neurobiol Aging*. 36:2568-2576.
- Spulber G, Niskanen E, Macdonald S, Kivipelto M, Padilla DF, Julkunen V, Hallikainen M, Vanninen R, Wahlund LO, Soininen H (2012). Evolution of global and local grey matter atrophy on serial MRI scans during the progression from MCI to AD. *Curr Alzheimer Res*. 9:516-524.
- Squitti R, Ghidoni R, Scrascia F, Benussi L, Panetta V, Pasqualetti P, Moffa F, Bernardini S, Ventriglia M, Binetti G, Rossini PM (2011). Free copper distinguishes mild cognitive impairment subjects from healthy elderly individuals. *J Alzheimers Dis*. 23:239-248.
- Squitti R, Ghidoni R, Siotto M, Ventriglia M, Benussi L, Paterlini A, Magri M, Binetti G, Cassetta E, Caprara D, Vernieri F, Rossini PM, Pasqualetti P (2014). Value of serum nonceruloplasmin copper for prediction of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 75:574-580.
- Staehelein HB (2005). Micronutrients and Alzheimer's disease. *Proc Nutr Soc*. 64:565-570.
- Steiger A, Dresler M, Kluge M, Schüssler P (2013). Pathology of sleep, hormones and depression. *Pharmacopsychiatry*. 46:S30-S35.
- Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT (2004). Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res*. 153:377-381.
- Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT (2003). In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis*. 18:147-154.

- Sun X, Bhadelia R, Liebson E, Bergethon P, Folstein M, Zhu JJ, Qiu WQ (2011). The relationship between plasma amyloid-beta peptides and the medial temporal lobe in the homebound elderly. *Intern J Geriatr Psychiatry*. 26:593-601.
- Sun X, He G, Qing H, Zhou W, Dobie F, Cai F, Staufenbiel M, Huang LE, Song W (2006). Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:18727-18732.
- Sutphen CL, Fagan AM, Holtzman DM (2014). Progress Update: Fluid and imaging biomarkers in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 75:520-526.
- Tabner BJ, El-Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Allsop D (2005). Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer's disease and familial British dementia. *J Biol Chem*. 280:35789-35792.
- Tabuchi M, Lone SR, Liu S, Liu Q, Zhang J, Spira AP, Wu MN (2015). Sleep interacts with A β to modulate intrinsic neuronal excitability. *Curr Biol*. 25:702-712.
- Tai LM, Mehra S, Shete V, Estus S, Rebeck GW, Bu, G, LaDu MJ (2014). Soluble apoE/A β complex: mechanism and therapeutic target for APOE4-induced AD risk. *Mol Neurodegener*. 9:1.
- Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, Pronzato MA, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M (2002). Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT 2 neurons. *Neurobiol Dis*. 10:279-288.
- Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, Ishikawa KY, Oguni E, Komatsuzaki Y, Shoji SI (1996). Amyloid β protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 141:65-68.
- Tan RH, Pok K, Wong S, Brooks D, Halliday GM, Kril JJ (2013). The pathogenesis of cingulate atrophy in behavioral variant frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 1:30.
- Tapiola T, Overmyer M, Lehtovirta M (1997). The level of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 8:3961-3963.
- Tappel AL (1978). Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol*. 52:506-513.
- Tateno A, Sakayori T, Kawashima Y, Higuchi M, Suhara T, Mizumura S, Mintun MA, Skovronsky DM, Honjo K, Ishihara K, Kumita S, Suzuki H, Okubo (2015). Comparison of imaging biomarkers for Alzheimer's disease: amyloid imaging with [18F]florbetapir positron emission tomography and magnetic resonance imaging voxel-based analysis for entorhinal cortex atrophy. *Int J Geriatr Psychiatry*. 30:505-513.
- Thadikkaran L, Siegenthaler MA, Crettaz D, Queloz PA, Schneider P, Tissot JD (2005). Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics*. 5:3019-3034.
- Thal LJ, Rosen W, Sharpless NS, Crystal H (1981). Choline chloride fails to improve cognition in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2:205-208.
- Thal DR, Rüb U, Schultz C (2000). Sequence of A β -protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol*. 59:733-748.
- Thambisetty M, Lovestone S (2010). Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med*. 4:65-79.
- Thinakaran G, Koo EH (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 283:29615-29619.
- Toledo JB, Shaw LM, Trojanowski JQ (2013). Plasma amyloid beta measurements-a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther*. 5:8.
- Toledo JB, Weiner MW, Wolk DA, Da X, Chen K, Arnold SE, Shaw LM (2014). Neuronal injury biomarkers and prognosis in ADNI subjects with normal cognition. *Acta Neuropathol Commun*. 2:26.
- Tong Y, Zhou W, Fung V, Christensen MA, Qing H, Sun X, Song W (2005). Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and A β generation. *J Neural Transm*. 112:455-469.

- Tranah GJ, Blackwell T, Stone KL, Ancoli-Israel S, Paudel ML, Ensrud KE, Cauley JA, Redline S, Hillier TA, Cummings SR, Yaffe K, SOF Research Group (2011). Circadian activity rhythms and risk of incident dementia and mild cognitive impairment in older women. *Ann Neurol.* 5:722-732.
- Tripathi M, Zhang CW, Singh BK, Sinha RA, Moe KT, DeSilva DA, Yen PM (2016). Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by vitamin B supplementation. *Cell Death Dis.* 7:e2513.
- Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH (2008). B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:12474-12479.
- Tsapanou A, Gu Y, O'Shea DM, Yannakoulia M, Kosmidis M (2017). Sleep quality and duration in relation to memory in the elderly: Initial results from the hellenic longitudinal investigation of aging and diet. *Neurobiol Learn Mem.* 141:217-225.
- Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC (2005). Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H264-H256.
- Ueda Y, Miyata T, Hashimoto T, Yamada H, Izuhara Y, Sakai H, Kurokawa K (1998). Implication of altered redox regulation by antioxidant enzymes in the increased plasma pentosidine, an advanced glycation end product, in uremia. *Biochem Biophys Res Commun.* 245:785-790.
- Unit N, Vergata RT, Mercuri I, Nitti P, Vergata R, Martorana S, Albanese M, Mercuri NB, Izzi F, Bernardini S, Nitti A, Sancesario GM, Sica F, Marciani MG, Placidi F (2014). Orexinergic system dysregulation, sleep impairment, and cognitive decline in alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 71:1498-1505.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K (2016). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 90:1-37.
- van Someren EJ, Hagebeuk EE, Lijzenga C, Scheltens P, de Rooij SE, Pot AM, Mirmiran M, Swaab DF (1996). Circadian rest-activity rhythm disturbances in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 40:259-270.
- Vanderstichele H, Kerschaver EV, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, Vanmechelen E (2000). Standardization of measurement of β -amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid.* 7:245-258.
- Vázquez J, Baghdoyan HA (2001). Basal forebrain acetylcholine release during REM sleep is significantly greater than during waking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280:R598-R601.
- Venturini D, Barbosa DS, Lavado EL, Narciso VES, Dichi I, Dichi JB (2010). Increased oxidative stress, decreased total antioxidant capacity, and iron overload in untreated patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci.* 55:1120-1127.
- Villafuerte G, Miguel-Puga A, Murillo Rodríguez E, Machado S, Manjarrez E, Arias-Carrión O (2015). Sleep deprivation and oxidative stress in animal models: a systematic review. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:234952.
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis K, Salvado A, Ames D (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 12:357-367.
- Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Masters CL, Rowe CC (2015). Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol.* 14:114-124.
- Vincent L, Soille P (1991). Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.* 13:583-598.
- Vitiello MV, Borson S (2001). Sleep disturbances in patients with Alzheimer's disease: Epidemiology, pathophysiology and treatment. *CNS Drugs.* 15:777-796.
- Vitiello MV, Prinz PN, Williams DE, Frommlet MS, Ries RK (1990). Sleep disturbances in patients with mild-stage Alzheimer's disease. *J Gerontol.* 45:M131-138.
- Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE (1980). Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res.* 18:113-121.

- Wei R, Li C, Fogelson N, Li L (2016). Prediction of conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease using MRI and structural network features. *Front Aging Neurosci.* 8:76.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:1858-1862.
- Weitzman ED, Moline ML, Czeisler CA, Zimmerman JC (1982). Chronobiology of aging: Temperature, sleep-wake rhythms and entrainment. *Neurobiol Aging.* 3:299-309.
- Westerberg CE, Lundgren EM, Florczak SM, Mesulam MM, Weintraub S, Zee PC (2010). Sleep influences the severity of memory disruption in amnesic mild cognitive impairment: results from sleep self-assessment and continuous activity monitoring. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 24:325-333.
- Westerberg CE, Mander BA, Florczak SM, Weintraub S, Mesulam MM, Zee PC, Paller KA (2012). Concurrent impairments in sleep and memory in amnesic mild cognitive impairment. *J Int Neuropsychol Soc.* 18:490-500.
- White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R (2001). Homocysteine potentiates copper and amyloid beta peptide mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem.* 76:1509-1520.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* 215:1237-1239.
- Whitwell JL, Przybelski SA, Weigand SD, Knopman D, Boeve BF, Petersen RC, Jack CR (2007). 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain.* 130:1777-1786.
- Whitwell JL, Tosakulwong N, Weigand SD, Senjem ML, Lowe VJ, Gunter JL, Boeve BF, Knopman DS, Dickerson BC, Petersen RC, Jack CR Jr (2013). Does amyloid deposition produce a specific atrophic signature in cognitively normal subjects? *Neuroimage Clin.* 2:249-257.
- Williams JH, Pereira EA, Budge MM, Bradley KM (2002). Minimal hippocampal width relates to plasma homocysteine in community-dwelling older people. *Age Ageing.* 31:440-444.
- Williams MJ, Perland E, Eriksson MM, Carlsson J, Erlandsson D, Laan L, Mahebalu T, Potter E, Fredriksson R, Benedict C, Schiöth HB (2016). Recurrent sleep fragmentation induces insulin and neuroprotective mechanisms in middle-aged flies. *Front Aging Neurosci.* 8:180.
- Wilson RS, McCann JJ, Li Y, Aggarwal NT, Gilley DW, Evans DA (2007). Nursing home placement, day care use, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.* 6:910-915.
- Witting W, Kwa IH, Eikelenboom P, Mirmiran M, Swaab DF (1990). Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 27:563-572.
- Wolf H, Hensel A, Kruggel F, Riedel-Heller SG, Arendt T, Wahlund LO, Gertz HJ (2004). Structural correlates of mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 25:913-924.
- Wolfe MS, Guénette SY (2007). APP at a glance. *J Cell Sci.* 120:3157-3161.
- World Alzheimer Report (2015). The global impact of dementia. Alzheimer's Disease International.
- World Health Organization and Alzheimer's Disease International 2012. Dementia: a public health priority. Mental Health Publications.
- Wu YH, Swaab DF (2007). Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease. *Sleep Med.* 8:623-636.
- Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science.* 342:373-377.
- Yaffe K, Barrett-Connor E, Lin F, Grady D (2002). Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. *Arch Neurol.* 59:378-384.

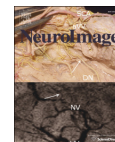
- Yaffe K, Westo A, Graff-Radford NR, Satterfield S, Simonsick EM, Younkin SG, Harris TB (2011). Association of plasma β -amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA*. 305:261-266.
- Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O (1983). Development and validation of a geriatric depression scale: a preliminary report. *J Psychiat Res*. 17:37-49.
- Yuan L, Liu J, Ma W, Dong L, Wang W, Che R, Xiao R (2016). Dietary pattern and antioxidants in plasma and erythrocyte in patients with mild cognitive impairment from China. *Nutrition*. 32:193-198.
- Zafrilla P, Mulero J, Xandr JM, Santo E, Caravaca G, Morillas JM (2006). Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr Med Chem*. 13:1075-1083.
- Zhang N, Chen S, Chen Y, Guo X, Sun G, Qian H, Sun Y (2016). Daytime sleepiness is associated with hyperhomocysteinemia in rural area of China: A cross-sectional study. *Eur J Intern Med*. 35:73-77.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 4:3.
- Zhang CE, Tian Q, Wei W, Peng JH, Liu GP, Zhou XW, Wang Q, Wang DW, Wang JZ (2008). Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 29:1654-1665.
- Zhang J, Zhu Y, Zhan G, Fenik P, Panossian L, Wang MM, Reid S, Lai D, Davis JG, Baur JA, Veasey S (2014). Extended wakefulness: compromised metabolics in and degeneration of locus ceruleus neurons. *J Neurosci*. 34:4418-4431.
- Zhao L, Yan Y, Wang Y, Cai Z (2013). Homocysteine contributes to pathogenesis by oxidative stress for Alzheimer's disease. *Aging Neurodegener*. 1:1.
- Zhou L, Chen P, Peng Y, Ouyang R (2016). Role of oxidative stress in the neurocognitive dysfunction of obstructive sleep apnea syndrome. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:9626831.
- Zhou B, Liu Y, Zhang Z, An N, Yao H, Wang P, Zhang X, Jiang T (2013). Impaired functional connectivity of the thalamus in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a resting-state fMRI study. *Curr Alzheimer Res*. 10:754-766.
- Zhuo JM, Portugal GS, Kruger WD, Wang H, Gould TJ, Pratico D (2010). Diet-induced hyperhomocysteinemia increases amyloid-beta formation and deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 7:140-149.
- Zlokovic BV (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 57:178-201.
- Zou CG, Banerjee R (2005). Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal*. 7:547-559.
- Zwan MD, Rinne JO, Hasselbalch SG, Nordberg A, Lleó A, Herukka SK, Soininen H, Law I, Bahl JM, Carter SF, Fortea J, Blesa R, Teunissen CE, Bouwman FH, van Berckel BN, Visser PJ (2015). Use of amyloid-PET to determine cutpoints for CSF markers: A multicenter study. *Neurology*. 86:50-58.
- Zwan M, van Harten A, Ossenkoppele R, Bouwman F, Teunissen C, Adriaanse S, Lammertsma A, Scheltens P, van Berckel B, van der Flier W (2014). Concordance between cerebrospinal fluid biomarkers and [11C]PIB PET in a memory clinic cohort. *J Alzheimers Dis*. 41:801-807.

ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

NeuroImage

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynimg

Sleep deficits in mild cognitive impairment are related to increased levels of plasma amyloid- β and cortical thinning



Mayely P. Sanchez-Espinosa, Mercedes Atienza, Jose L. Cantero*

Laboratory of Functional Neuroscience, Spanish Network of Excellence for Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Pablo de Olavide University, Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 10 May 2014

Available online 16 May 2014

Keywords:

Sleep disturbances

Plasma amyloid-beta

Cortical thickness

Mild cognitive impairment

Alzheimer's disease

ABSTRACT

Evidence suggests that amyloid-beta ($A\beta$) depositions parallel sleep deficits in Alzheimer's disease (AD). However, it remains unknown whether impaired sleep and changes in plasma $A\beta$ levels are related in amnesic mild cognitive impairment (aMCI) subjects, and whether both markers are further associated with cortical thinning in canonical AD regions. To jointly address this issue, we investigated relationships between changes in physiological sleep and plasma $A\beta$ concentrations in 21 healthy old (HO) adults and 21 aMCI subjects, and further assessed whether these two factors were associated with cortical loss in each group. aMCI, but not HO subjects, showed significant relationships between disrupted slow-wave sleep (SWS) and increased plasma levels of $A\beta_{342}$. We also found that shortened rapid-eye movement (REM) sleep in aMCI correlated with thinning of the posterior cingulate, precuneus, and postcentral gyrus; whereas higher levels of $A\beta_{340}$ and $A\beta_{342}$ accounted for grey matter (GM) loss of posterior cingulate and entorhinal cortex, respectively. These results support preliminary relationships between $A\beta$ burden and altered sleep physiology observed in animal models of AD amyloidosis, and provide precise cortical correlates of these changes in older adults with aMCI. Taken together, these findings open new research avenues on the combined role of sleep, peripheral $A\beta$ levels and cortical integrity in tracking the progression from normal aging to early neurodegeneration.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The aggregation of $A\beta$ into toxic oligomers plays a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), the most common cause of long-term institutionalization in persons over 65 in developing countries (Reitz et al., 2011). $A\beta_{340}$ and $A\beta_{342}$ isoforms are the major constituents of amyloid plaques, $A\beta_{340}$ being the most common and $A\beta_{342}$ more fibrillogenic and prone to pathological states (Burdick et al., 1992; Iwatsubo et al., 1994). According to the amyloid cascade hypothesis, accumulation of extraneuronal $A\beta$ deposits results in neuronal death and synaptic failures that impair cognitive function and ultimately may lead to AD (Hardy and Selkoe, 2002). Although mechanisms of $A\beta$ -related cognitive deficits have been extensively studied (Cleary et al., 2005; Shankar et al., 2008; Stephan et al., 2001), the impact of $A\beta$ burden on non-cognitive symptoms of AD is unknown to date.

Sleep disturbances are one of the most troubling symptoms during progression of AD (Loewenstein et al., 1982; Prinz et al., 1982; Vitiello et al., 1990). Recent studies have revealed a link between the presence of $A\beta$ plaques and the occurrence of sleep disturbances in a mouse model of AD amyloidosis. More specifically, disrupted sleep patterns

emerged after early deposition of $A\beta$ plaques in the hippocampus of APP-PS1 mice and reversed after active immunization with $A\beta_{342}$ (Roh et al., 2012). However, it remains to be determined whether association between impaired sleep and $A\beta$ load is extended to humans, and more precisely to early stages of neurodegeneration.

Growing evidence suggests that sleep disturbances begin years before the clinical onset of AD (Geda et al., 2004; Hita-Yañez et al., 2012; Lee et al., 2008; Westerberg et al., 2012). Accordingly, we have recently found that aMCI subjects, older adults at higher risk for AD (Petersen et al., 1999), showed reduced REM sleep and disrupted SWS (Hita-Yañez et al., 2012) together with a higher prevalence of self-reported sleep problems and sleep onset misperception when compared to HO adults (Hita-Yañez et al., 2013). MCI subjects also show significant changes in plasma $A\beta$ levels (Mayeux et al., 2003; Schupf et al., 2008; van Oijen et al., 2006) in addition to AD lesions, confirmed histopathologically, in cingulate and parieto-temporal cortical structures (Driscoll et al., 2009; Hänggi et al., 2011; Whitwell et al., 2007). However, it remains unknown if sleep disturbances and plasma $A\beta$ levels observed in MCI subjects are associated with loss of cortical integrity in these canonical AD regions.

To jointly address this issue, we first determined whether plasma $A\beta$ levels are related to changes in sleep physiology and/or cortical thinning in aMCI subjects. Second, we investigated if sleep deficits and/or increased $A\beta$ levels reported in aMCI subjects accounted for patterns of cortical loss characteristic of incipient neurodegeneration.

* Corresponding author at: Laboratory of Functional Neuroscience, Pablo de Olavide University, Ctra. de Utrera Km 1, 41013 – Seville, Spain.
E-mail address: jcanlor@upo.es (J.L. Cantero).

Material and methods

Subjects

Twenty-one older adults with aMCI (6 females, mean age: 69.8 ± 6.4 yr) and 21 HO subjects (10 females, mean age: 66.9 ± 5.5 yr) were enrolled in the study. Participants were primarily recruited from older people's associations, normal community health screening, and hospital outpatient services. All of them gave informed consent prior to experiments. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Human Research Ethics Committee of the Pablo de Olavide University. Here, we used the same sample employed in a previous study (Hita-Yañez et al., 2012) with the exception of 8 subjects who were excluded due to lack of plasma samples and/or cerebral magnetic resonance imaging (MRI). Each participant underwent structured, uniform evaluation that included a medical history, neurological examination, and cognitive function testing. Only those who met criteria for HO or aMCI status (see below) were included in the study.

aMCI subjects showed an idiopathic amnesic disorder with absence of impairment in cognitive areas other than memory as revealed by neuropsychological testing; they further met the diagnostic criteria of aMCI proposed by Petersen et al. (1999): (i) subjective memory complaints corroborated by the informant; (ii) objective memory loss confirmed by the Spanish version of the Logical Memory subtest extracted from the Wechsler Memory Scale-Third Edition (Wechsler, 2004) (scorings 1.5 standard deviations below the age-appropriate mean); (iii) global score of 0.5 (questionable dementia) in the clinical dementia rating (CDR) (Hughes et al., 1982); (iv) normal independence function, judged both clinically and by means of the interview for deterioration in daily living activities validated in the Spanish population (Böhm et al., 1998); and (v) no DSM-IV criteria for dementia. The global cognitive status was assessed by the Spanish version of the Mini Mental State Examination (MMSE) (Lobo et al., 1979). Depression was excluded with the shorter version of the Geriatric Depression Scale (Yesavage et al., 1983). Inclusion criteria for HO subjects were (i) absence of cognitive impairment (memory, language, attention, and executive function) confirmed by neuropsychological testing; (ii) CDR global score of 0 (no dementia); and (iii) normal independent function. Depression symptoms were excluded by using the same criteria as for aMCI subjects. HO and aMCI subjects were tested with the same neuropsychological battery.

Cerebral MRI was previously examined in all participants to rule out lesions such as territorial cerebral infarction, brain tumor, hippocampal sclerosis, and/or vascular malformations. Those participants with large periventricular and/or deep white matter lesions, revealed by scores ≥ 2 on the Fazekas ischemic scale (Fazekas et al., 1987), were excluded from the study. Subjects reporting a history of neurological, psychiatric disorders, and/or major medical illness (chronic renal, hepatic, pulmonary or endocrine) were not allowed to participate.

The absence of secondary causes of cognitive deficits was confirmed by laboratory tests including complete blood count, blood chemistry, vitamin B12/folate, and thyroid function tests. None of the participants were taking cholinesterase inhibitors and/or medication affecting the sleep-wake cycle (benzodiazepines, tricyclic and/or serotonin reuptake inhibitors) at the time of recruiting or during the study. Neither did they report sleep-disordered breathing, movement disorders during sleep nor unusual sleep schedules (e.g., shift work), which was corroborated by their bed partners and/or caregivers. Individual scores of the Epworth Sleepiness Scale (ESS) were below the cut off for suspected sleep disorders associated with excessive daytime sleepiness (Johns, 1991).

Plasma A β levels

Venous blood samples were obtained after overnight fasting. Blood samples were collected in 10 mL K2-ethylenediaminetetraacetic

acid (EDTA) coated tubes (BD Diagnostics), and further centrifuged (3500 rpm) at 4 °C for 5 min. Supernatant plasma was collected and aliquoted into 250- μ L polypropylene tubes containing 8.32 μ L of a protease inhibitor cocktail (cOmplete Ultra Tablets mini, Roche). Plasma samples were stored at -80 °C and thawed immediately before assay.

Plasma A β levels were measured blind to cognitive status in duplicate samples (50 μ L) according to manufacturer's instructions (Invitrogen). Averaged values (pg/ml) were used for statistical analyses. Human A β_{340} and ultra sensitive A β_{342} specific enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits were used for this purpose. The detection limit of these assays was 0.52 pg/ml for A β_{340} and 0.27 pg/ml for A β_{342} . Both inter-assay and intra-assay coefficients of variation were below 10%. The A β_{342} /A β_{340} ratio was additionally computed for each subject given its ability to identify cognitively normal subjects who later converted to MCI or AD (Graff-Radford et al., 2007).

Polysomnographic sleep recordings

The polysomnographic (PSG) protocol included electroencephalographic (EEG) recordings, vertical and horizontal electrooculography, and electromyography of submental muscles. Electrophysiological recordings were performed with gold cup, 10 mm diameter electrodes (Grass, USA) filled with electrolytic cream, and attached with surgical tape (face placements) and collodion (scalp placements). Overnight PSG recordings were performed in a sound-attenuated bedroom with infrared video-controlled supervision.

PSG recordings were amplified (BrainAmp MR, Brain Products, Germany), filtered (0.1–100 Hz bandpass), digitized (250 Hz, 16-bit resolution), and stored in digital format for subsequent analyses. Scoring of sleep stages was performed by a trained technician, blind to the study purpose, following standard criteria (Rechtschaffen and Kales, 1968). Criteria for scoring EEG arousals were taken from the American Sleep Disorders Association report (American Sleep Disorder Association, 1992); the level of sleep fragmentation was determined by computing the arousal index in each sleep stage. This index resulted from dividing the number of arousals in a sleep stage by the time (in hours) spent in that sleep stage. Only those PSG parameters that showed significant group differences between HO and aMCI subjects (Hita-Yañez et al., 2012) were correlated with plasma A β levels and cortical thickness in each group.

Cerebral MRI acquisition, image preprocessing and cortical thickness estimation

Cerebral images were acquired on a whole-body Philips Achieva 3 T MRI scanner equipped with an 8-channel head coil. A high-resolution MP-RAGE (magnetization-prepared rapid gradient echo) T1-weighted cerebral scan was obtained from each participant. Acquisition parameters were empirically optimized for grey/white matter contrast (repetition-time = 2300 ms, echo-time = 4.5 ms, flip angle = 8°, matrix dimensions 320 \times 320, 0.8 isotropic voxel, no gap between slices, time per acquisition = 9.1 min).

Measurements of cortical thickness were obtained with Freesurfer v5.1 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) following standardized analysis protocols. Briefly, individual brain scans were reoriented, normalized for intensities, and resampled to 1-mm isotropic voxels. Skull stripping was automatically performed for each previously normalized brain volume using a hybrid approach that combines watershed algorithms and a deformable surface (Segonne et al., 2004). To obtain individual cortical surfaces, we applied a semi-automated procedure that includes i) segmentation of the white matter, ii) tessellation of the grey/white matter boundaries, iii) inflation of the cortical surface, and iv) automatic correction of topological defects (Dale et al., 1999). Removal of non-brain tissues was manually performed in each participant. Next, cortical surfaces were automatically constrained to a spherical topology (Fischl et al., 2001) for which parameterization,

surface registration and bases were previously provided (Fischl et al., 1999a; Van Essen et al., 1998). Pial/white matter boundaries were manually enhanced on a slice-by-slice basis in each participant to increase the reliability of cortical thickness measurements. Special attention was paid to cortical regions at the border with cerebrospinal fluid (CSF) in order to avoid partial volume effects.

Thickness measurements were obtained from the individual reconstructed cortical surfaces with submillimeter accuracy. Cortical thickness at each vertex was defined as the average of the shortest distance between vertices of the grey/white matter boundary and the pial surface computed in both directions (Fischl and Dale, 2000). Individual thickness maps were further transformed into the same spherical coordinate system of cortical surfaces, and then resampled to the average spherical surface by aligning each individual cortical folding pattern to the average folding pattern of the entire population. This procedure has demonstrated enhancement of localization of cortical features among participants, minimizing metric distortions (Fischl et al., 1999b). Methods employed here for the measurement of cortical thickness have previously been validated against histological data (Rosas et al., 2002) and manual segmentation (Kuperberg et al., 2003; Salat et al., 2004). Cortical thickness maps were finally smoothed using non-linear spherical wavelet-based denoising schemes, which have previously demonstrated enhanced specificity and sensitivity at detecting local and global changes in cortical thickness (Bernal-Rusiel et al., 2008).

Spatial filters based on non-linear spherical wavelets depend on three parameters: i) the oscillation factor, which controls the shape of the filter; ii) the dilation factor, which correspond to the extent of the spatial smoothing (this value is not equivalent to the full width at half maximum value of the Gaussian kernel); and iii) the number of the finest decomposition levels at which the thresholding is applied. Based on previous studies (Bernal-Rusiel et al., 2008), we applied an oscillation factor of 1 and a threshold-fine level of 1 because these values have obtained the best results in cortical thickness analyses. By applying sequential statistical thresholding based on a previously validated hierarchical model (Bernal-Rusiel et al., 2010), we further determined that the optimal extent of the smoothing (dilation factor) fluctuated from 3 to 11, depending on the statistical contrast.

All analyses were performed in Dell™ T7400 workstations, (4 Intel Xeon™ Dual Core processors, 3.2 GHz each, 32 GB RAM) with MATLAB® v. 7.9 running on Linux Centos4 X86-64 bits.

Statistical analyses

We previously assessed the normality assumption of our data by using the Kolmogorov-Smirnov test. All demographics, cognitive scores, sleep parameters and plasma A β values were normally distributed, allowing us to apply parametric statistical tests.

Group differences in demographic and cognitive variables were assessed with unpaired t-tests, whereas the influence of gender was tested with the chi-square test due to the categorical nature of this variable. Group differences in PSG sleep parameters and plasma A β levels (A β ₄₀, A β ₄₂, A β ₄₂/A β ₄₀ ratio) were assessed by a multivariate analysis of covariance (MANCOVA), adjusted for age and gender. Next, linear regression analyses were conducted to determine if group differences in PSG sleep were significantly associated with changes in plasma A β levels. If at least one of the two groups reached significant correlations, differences between regression slopes were further assessed. All regression analyses were also adjusted for age and gender. These statistical analyses were performed with SPSS v. 15 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Group differences in cortical thickness between HO and aMCI subjects were assessed for the original (21 subjects per group) and for a smaller sample matched in age and gender (16 subjects per group). By using a hierarchical statistical model (Bernal-Rusiel et al., 2010), we performed an analysis of covariance (ANCOVA) for each hemisphere including group as the main factor (HO and aMCI), and age, gender, and normalized mean cortical thickness as covariates. The significance

threshold was set at $P < 0.05$ after correcting for multiple comparisons, with a cluster extent threshold of 90 vertices.

Relationships between cortical thickness and sleep deficits (i.e., REM percentage and density of SWS arousals) or plasma A β levels (A β ₄₀, A β ₄₂, A β ₄₂/A β ₄₀ ratio) were assessed in each hemisphere for HO and aMCI subjects separately, by using linear regression analyses adjusted for age, gender and normalized mean cortical thickness (corrected for multiple comparisons, $P < 0.05$; cluster extend threshold >90 vertices). If at least one of the two groups showed significant correlations, we then assessed group differences between regression slopes. To further determine the influence of plasma A β levels on the above relationship, we separately included A β markers that reached significance as nuisance variable in the general statistical model. Likewise, we investigated relationships between plasma A β levels and changes in cortical thickness by removing effects of significant sleep deficits (i.e., REM percentage and density of SWS arousals).

Statistical relationships between cortical thickness and changes in either sleep or significant A β markers were assessed using a hierarchical statistical model. This methodology aims at controlling erroneous detections in two sequential steps: firstly, at the cluster level, over smoothed statistical maps via random field theory; and secondly at the vertex level, over unsmoothed statistical maps by applying an adaptive false discovery rate procedure to clusters previously detected. The superior performance of this methodology over other statistical approaches has previously been confirmed in simulation studies, and further validated in a cross-sectional experiment comparing moderate AD patients with HO subjects (Bernal-Rusiel et al., 2010).

Results

Demographic and cognitive profile

Both groups were statistically similar in age, gender and years of education. As expected, they differed in global cognitive status and memory function (Table 1). In particular, aMCI showed lower MMSE scores ($P = 0.01$), impaired immediate ($P = 3 \times 10^{-6}$) and delayed recall ($P = 5 \times 10^{-9}$) compared to HO subjects.

Plasma A β levels

Table 2 shows mean values of plasma A β levels in HO and aMCI. Overall, plasma A β levels differed between the two groups ($F_{3,36} = 4.41$, $P = 0.01$). Univariate analyses revealed that aMCI subjects showed significantly higher concentrations of A β ₄₀ ($P = 0.006$) and A β ₄₂ ($P = 0.002$) than HO subjects (Fig. 1B), whereas group differences in the A β ₄₂/A β ₄₀ ratio didn't reach significance.

PSG sleep

Table 3 summarizes sleep/wake results in the study population. Briefly, REM sleep was significantly shortened ($P = 0.03$) and SWS was more disrupted ($P = 10^{-5}$) in aMCI than in HO subjects (Fig. 1A).

Table 1
Demographic and cognitive profile of the study population.

	HO	aMCI	P
Age, yr	67 ± 5.5	69.8 ± 6.5	0.1
Gender (F/M)	10/11	6/15	0.2
Education, yr	8.6 ± 4.3	8.2 ± 5.4	0.8
CDR (sum of boxes)	0	0.5	N/A
MMSE	28.3 ± 1.3	26.7 ± 2.5	0.01*
Immediate recall	14.2 ± 2.9	9.3 ± 2.8	3×10^{-6} *
Delayed recall	13.3 ± 2.7	6.5 ± 4	5×10^{-9} *

Results are expressed as mean ± standard deviation. F/M (female/male). CDR: Clinical Dementia Rating; CDR = 0: no dementia; CDR = 0.5: questionable or very mild dementia; MMSE: Mini-Mental State Examination (0–30); N/A: not applicable.

Table 2
Plasma Aβ levels of the study population.

Aβ marker	HO	aMCI	P
Aβ ₄₀ (pg/ml)	36.4 ± 3.9	56.6 ± 5.5	6 × 10 ^{-3*}
Aβ ₄₂ (pg/ml)	4 ± 0.3	6.1 ± 0.4	2 × 10 ^{-3*}
Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀	0.23 ± 0.08	0.12 ± 0.08	0.2

Results are expressed as mean ± standard error of the mean. *Post hoc after significant MANCOVA, adjusted for age and gender.

Subjective levels of daytime sleepiness were not statistically different between the two groups (Table 3), ESS scores were below the cut off for suspecting sleep disorders associated with excessive daytime sleepiness in all participants, and they were not significantly correlated with either cognitive or sleep/wake variables considered in the present study.

Relationships between disturbed sleep physiology and plasma Aβ levels

Evidence suggests that Aβ deposits are associated with sleep deficits in APP-PS1 mice (Roh et al., 2012). To test if this relationship can be extended to different aging trajectories in humans, we investigated whether impaired sleep patterns (i.e., decreased REM and increased SWS fragmentation) correlated with plasma Aβ levels in HO and aMCI subjects. Regression analyses showed positive correlations between density of SWS arousals and levels of Aβ₄₂ in aMCI (F_(3,20) = 3.8, P = 0.03; r = 0.57, P = 0.02), but not in HO subjects (Fig. 1C). Significant group differences in the relationship between these two factors were further confirmed by comparing regression coefficients

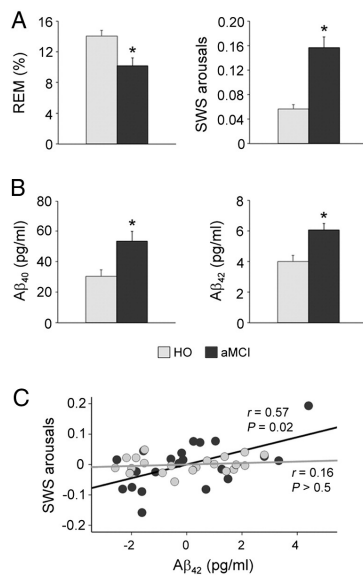


Fig. 1. Sleep disturbances and plasma Aβ levels in aMCI subjects. A. Significant differences in physiological sleep between HO and aMCI subjects. Arousal density in slow-wave sleep (SWS, stage 3 + 4) was determined by dividing the number of arousals in SWS by the time (in hours) spent in SWS. REM: rapid-eye movement sleep. B. Significant differences in plasma Aβ levels between HO and aMCI subjects. C. Regression plot displaying correlations between SWS arousals and plasma Aβ₄₂ levels in HO (light grey circles) and aMCI subjects (dark grey circles). All statistical analyses were adjusted for age and gender.

Table 3
Sleep/wake patterns of the study population.

	HO	aMCI	P
<i>Sleep parameters</i>			
TST (min.)	395.7 ± 30.7	372.6 ± 55.5	0.2
Sleep latency	11.7 ± 7.4	15 ± 7.1	0.1
Stage 2 (%)	34.6 ± 6.9	36.3 ± 9.3	0.3
SWS (%)	23.6 ± 7	22.7 ± 12.2	0.8
REM (%)	14.1 ± 3.4	10.1 ± 4.6	0.03*
Sleep efficiency (%)	83.8 ± 6.1	78.6 ± 11.5	0.3
<i>Wake parameters</i>			
WASO (%)	13.2 ± 5.8	15.6 ± 6.2	0.5
AI Stage 2	0.31 ± 0.17	0.25 ± 0.13	0.1
AI SWS	0.05 ± 0.03	0.15 ± 0.08	2 × 10 ^{-5*}
AI REM	0.18 ± 0.14	0.22 ± 0.09	0.2
<i>Daytime sleepiness</i>			
ESS	5.2 ± 2.4	5.6 ± 3.5	0.6

Results are expressed as mean ± standard deviation. TST: total sleep time; WASO: wake after sleep onset; SWS: slow-wave sleep; REM: rapid-eye movement sleep; AI: arousal index. *Post hoc after significant MANCOVA, adjusted for age and gender.

(P = 0.002). No significant relationship was found between other plasma Aβ markers and sleep changes neither in aMCI nor in HO subjects.

Group differences in cortical thickness

Group differences in cortical thickness were assessed for the original sample (21 subjects per group; HO: mean age ± SD = 67 ± 5.5 yr; aMCI: mean age ± SD = 69.8 ± 6.5 yr, t-Student P = 0.1; HO: 11 males and 10 females; HO: 15 males and 6 females), and for a smaller sample (16 subjects per group) matched in age (HO: mean ± SD = 68.8 ± 5.1 yr; aMCI: mean ± SD = 69 ± 5.2 yr; t-Student P = 0.9) and gender (10 males and 6 females in each group).

Results obtained with the original sample (N = 42 subjects) showed a significant thinning of the right precuneus (Fig. SM1, left panel) in aMCI subjects (corrected P < 0.0001; cluster size = 191 mm²), which was confirmed in the age-gender matched sample (N = 32 subjects) (uncorrected P < 0.0005; cluster size = 162 mm²) and extended to posterior cingulate (uncorrected P < 0.002; cluster size = 58 mm²), anterior cingulate (uncorrected P < 0.002; cluster size = 52 mm²), and orbitofrontal cortex (uncorrected P < 0.003; cluster size = 100 mm²) (Fig. SM1, right panel).

Relationships between disturbed sleep physiology and cortical integrity

We next examined if sleep deficits were associated with specific patterns of cortical thinning in each group. Shortened REM sleep in aMCI was significantly correlated with cortical thinning in the left posterior cingulate (corrected P = 3 × 10⁻⁵), left precuneus (corrected P = 4 × 10⁻⁴), and bilateral postcentral gyri (left: corrected P = 2 × 10⁻⁴; right: corrected P = 9 × 10⁻⁷). These results are displayed in Fig. 2A together with atlas-based cytoarchitectonic delimitation of significant regions on cortical flattened surfaces (Fig. 2B). No significant relationship between REM sleep and cortical thickness was found in HO subjects. Table 4 includes additional information on significant correlations between reduced REM sleep and cortical thinning in aMCI subjects.

When plasma levels of Aβ₄₀ and Aβ₄₂ were added to the general linear model, most of the above significant correlations failed to reach significance. In order to assess whether these findings stemmed from a reduction of statistical power, correlation analyses were restricted to regions in which REM sleep showed significant correlations with cortical thickness. Most of correlations survived this analysis, except for those performed with the precuneus, although significances were restricted to smaller areas [27 mm² for left posterior cingulate and postcentral gyrus after adding Aβ₄₀ as nuisance factor (r = 0.68;

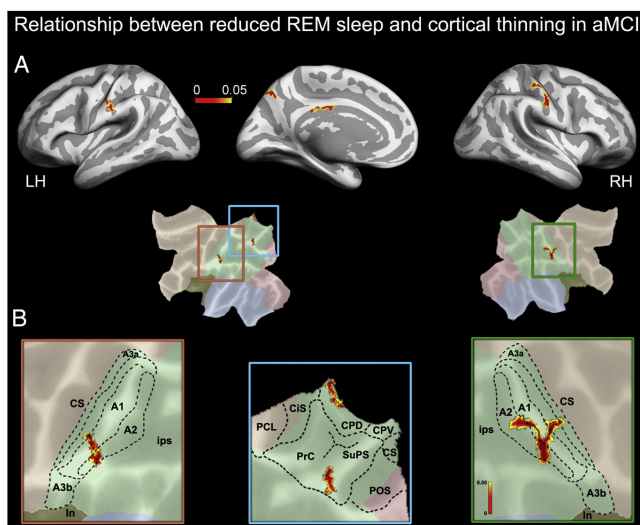


Fig. 2. Relationship between decreased REM sleep and cortical thinning in aMCI subjects. A. Sites of significant correlations between cortical thinning and decreased REM sleep in aMCI subjects, after adjusting for age, gender and normalized mean cortical thickness (corrected for multiple comparisons, $P < 0.05$; cluster extend threshold > 90 vertices). LH: left hemisphere; RH: right hemisphere. B. Representation of significant clusters on flattened cortical surfaces derived from human cytoarchitectonic maps of the affected regions. Abbreviations for the primary somatosensory cortex (Greiner et al., 1999): A1, A2, A3a, A3b – Area 1, Area 2, Area 3a, Area 3b of primary somatosensory cortex; CS – central sulcus; ips – intraparietal sulcus; In – insula. Abbreviations for the superior parietal lobe (Scheperjans et al., 2008): PCL – posterior paracentral lobe; CIS – cingulate sulcus; PrC – precuneus; CPD – cingulate postdorsal; CPV – cingulate postventral; SuPS – subparietal sulcus; CS – central sulcus; POS – parieto-occipital sulcus.

$P = 5 \times 10^{-5}$); 54 mm² for left posterior cingulate ($r = 0.67$; $P = 8 \times 10^{-5}$) and 85 mm² for left postcentral gyrus ($r = 0.48$; $P = 0.002$) after adding $A\beta_{42}$ as nuisance factor]. These findings suggest that plasma $A\beta$ levels mediate the relationship between REM sleep and thinning of precuneus in aMCI subjects.

The density of arousals during SWS was not significantly related to cortical thinning neither in HO nor in aMCI subjects, regardless of whether or not plasma $A\beta$ levels were added to the statistical model.

Relationships between plasma $A\beta$ levels and cortical integrity

We further investigated whether changes in plasma $A\beta$ levels correlated with patterns of cortical thinning in each group. These analyses showed that $A\beta$ levels were not significantly related to changes in cortical thickness in HO subjects. However, $A\beta_{40}$ levels were significantly related to thinning of bilateral posterior cingulate cortex (left: corrected $P = 10^{-5}$; right: corrected $P = 4 \times 10^{-5}$) in aMCI subjects (Figs. 3A and B, left panel). In line with the lack of relationship between density of SWS arousals and cortical thickness in aMCI, adding SWS arousals as nuisance variable to the statistical model had no effect on results (left: corrected $P = 6 \times 10^{-5}$; right: corrected $P = 9 \times 10^{-5}$). On the contrary, correlations between increased $A\beta_{40}$ levels and thinning of bilateral posterior cingulate cortex failed to reach significance when REM sleep

was added to the statistical model. In principle, this result matches our expectations because both $A\beta_{40}$ levels and REM duration correlated with cortical thinning in the left posterior cingulate. However, a closer look at results illustrated in Figs. 2 and 3 reveals that affected areas of the left posterior cingulate were slightly different in each particular case. Correlation with REM sleep was more evident in BA23 (Table 4) whereas correlation with $A\beta_{40}$ levels reached its maximum in BA31 (Table 5). When regression analyses were limited to these particular regions adding either REM duration or $A\beta_{40}$ levels as nuisance variables, the original correlations survived this analysis although results were restricted to a smaller area (REM as nuisance: 41 mm²; $r = 0.55$; $P = 5 \times 10^{-3}$; $A\beta_{40}$ as nuisance: 27 mm²; $r = 0.68$; $P = 5 \times 10^{-6}$).

Results further revealed that increased $A\beta_{42}$ levels were significantly associated with thinning of the right entorhinal cortex (corrected $P = 3 \times 10^{-5}$) in aMCI subjects (Figs. 3A and B, right panel). This relationship remained intact after adding density of SWS arousals to the statistical model but vanished after introducing REM sleep as nuisance variable. The latter was unexpected because REM duration was neither related to $A\beta_{42}$ levels nor to thinning of the right entorhinal cortex. To better understand this result, we limited the regression analysis to this region with REM as nuisance factor. The lack of relationship between $A\beta_{42}$ levels and cortical thinning was confirmed; suggesting that reduced REM sleep influenced the strength of association between levels of $A\beta_{42}$ and GM in the right entorhinal cortex of aMCI subjects.

Table 4
Relationship between reduced REM sleep and cortical thinning in aMCI subjects.

Cortical region (BA)	Hemisphere	CS (mm ²)	P	T	r
Postcentral gyrus (BA3)	R	420	9×10^{-7}	4.3	0.56
Postcentral gyrus (BA3)	L	176	2×10^{-4}	4.3	0.56
Precuneus (BA7)	L	133	4×10^{-4}	4.1	0.54
Posterior cingulate (BA23)	L	76	3×10^{-5}	5	0.6

BA: Brodmann area; L: Left; R: Right; CS: cluster size; P: corrected P-value for the cluster; T: t statistic for the cluster. r: correlation value.

Discussion

Evidence suggests that $A\beta$ levels are modulated by the sleep-wake cycle in mice and humans, peaks occurring in periods of greatest physical activity and valleys coinciding with sleep (Bateman et al., 2007; Huang et al., 2012; Kang et al., 2009). Understanding relationships between $A\beta$ levels and sleep might have deep implications for the slowing of AD progression, given that sleep disturbances are considered among

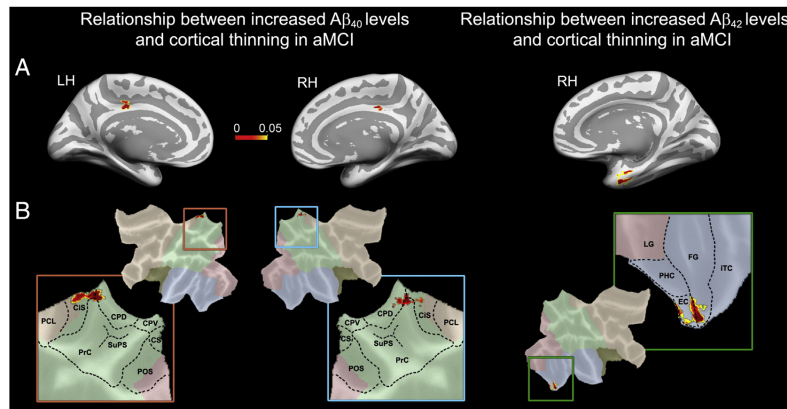


Fig. 3. Relationship between increased plasma Aβ levels and cortical thinning in aMCI subjects. A. Sites of significant correlations between cortical thinning and decreased REM sleep in aMCI subjects, after adjusting for age, gender and normalized mean cortical thickness (corrected for multiple comparisons, $P < 0.05$; cluster extend threshold > 90 vertices). LH: left hemisphere; RH: right hemisphere. B. Representation of significant clusters on flattened cortical surfaces derived from human cytoarchitectonic maps of the affected regions. Abbreviations for the superior parietal lobe (Scheperjans et al., 2008): PCL – posterior paracentral lobe; CIS – cingulate sulcus; PrC – precuneus; CPD – cingulate postdorsal; CPV – cingulate postventral; SuPS – subparietal sulcus; CS – central sulcus; POS – parieto-occipital sulcus. Abbreviations for the entorhinal cortex (McDonald et al., 2000): EC – entorhinal cortex; PHC – parahippocampal cortex; FG – fusiform gyrus; ITC – inferior-temporal cortex; LG – lingual gyrus.

the most troubling symptoms of AD (Loewenstein et al., 1982; Prinz et al., 1982; Vitiello et al., 1990). A first look at the association between the presence of Aβ aggregates and sleep has revealed that sleep deficits occur after plaque formation in a mouse model of AD amyloidosis (Roh et al., 2012). Our study extends these findings to aMCI subjects, and provides precise cortical correlates of the link between plasma Aβ levels and sleep disturbances in this population at AD risk.

Linking plasma Aβ levels to impaired sleep in aMCI subjects

Accumulated evidence suggests that the MCI status results from a constellation of pathologic, molecular and cellular mechanisms, in which Aβ pathology plays a central role (Hardy and Selkoe, 2002). Accordingly, *postmortem* studies have established that density of neuritic plaques in neocortex and hippocampus is greater in MCI subjects than in older adults cognitively intact, and considerably less in MCI than in AD patients (Haroutunian et al., 1998). This result has been further confirmed by prospective studies showing that accumulation of Aβ plaques in different neocortical regions strongly correlates with impaired cognitive function along the MCI-AD continuum (Sabbagh et al., 2010). Given that the pathogenic constituent of cerebral amyloid plaques are the

Aβ₄₀ and Aβ₄₂ isoforms, it is not surprising to find enhanced Aβ levels in the brain of MCI subjects. The latter has been extensively corroborated with [(11)C]Pittsburgh Compound B (PiB)-positron emission tomography (PET) scans, showing that patterns of PiB retention in MCI largely resemble that observed in AD patients (Forsberg et al., 2008; Kemppainen et al., 2007). Furthermore, PiB levels in the temporal cortex have demonstrated accounting for episodic memory deficits in MCI subjects (Chetelat et al., 2011).

The current study reveals that increased plasma levels of Aβ₄₂ parallels higher SWS fragmentation in aMCI subjects. Mechanisms by which Aβ-related brain pathology is associated with sleep disruptions have started to be unveiled. Mutual interactions between Aβ-induced endoplasmic reticulum (ER) stress and sleep fragmentation could provide a plausible explanation for this relationship. Aβ deposition triggers the unfolded protein response (Chafekar et al., 2008; Nishitsuji et al., 2009; Takahashi et al., 2009; Umeda et al., 2011), a cellular stress response leading to perturbed calcium homeostasis, increased protein accumulation, loss of ER function, and activation of apoptotic cascades when the ER stress response is persistent (Kim et al., 2008; Walter and Ron, 2011). Sleep loss and sleep fragmentation have also demonstrated exacerbation of the ER stress (Naidoo, 2012) together with aging (Naidoo et al., 2008). Therefore, the combination of fragmented SWS and high Aβ load may boost inadequate ER stress responses in early stages of neurodegeneration, and ultimately pave the way for AD.

Our results do not clarify whether higher plasma Aβ levels lead to sleep loss or *vice versa*. Different lines of evidence support the two possibilities. First, it has recently been found that Aβ aggregates induce neural damage that, in turn, leads to impaired sleep in APP-PS1 mice. This damage was attributed to a loss of metabolic coupling between lactate and diurnal Aβ oscillations impeding Aβ clearance by astrocytes and causing synaptic failures due to neurotoxic effects of glutamate accumulation (Roh et al., 2012). Second, HO subjects under conditions resulting in poor sleep quality, like sleep-disordered breathing (Yaffe et al., 2011) and circadian disturbances (Tranah et al., 2011), have shown increased risk to developing MCI or dementia. And these sleep disturbances are intensified with severity of AD (Moe et al., 1995).

However, mechanisms by which disrupted sleep could exacerbate Aβ-related pathology remain unknown to date. One potential explanation comes from aging-related dysfunctions of the hypothalamic-orexin

Table 5
Relationships between increased plasma Aβ levels and cortical thinning in aMCI subjects.

Cortical region (BA)	Hemisphere	CS (mm ²)	P	T	r
Aβ ₄₀ Posterior cingulate (BA31)	L	144	10 ⁻⁵	5.5	0.66
	R	58	4 × 10 ⁻⁵	4.9	0.61
Aβ ₄₂ Entorhinal cortex (BA28)	R	282	3 × 10 ⁻⁵	5	0.62
Aβ ₄₀ (SWS as nuisance factor) Posterior cingulate (BA31)	L	188	6 × 10 ⁻⁵	4.5	0.58
	R	116	9 × 10 ⁻⁵	4.7	0.6
Aβ ₄₂ (SWS as nuisance factor) Entorhinal cortex (BA28)	R	177	4 × 10 ⁻⁴	2.3	0.34

Aβ: amyloid-beta; BA: Brodmann area; SWS: slow-wave sleep; L: Left; R: Right; CS: cluster size; P: corrected P-value for the cluster; T: t statistic for the cluster. r: correlation value.

system. Endogenous orexins are involved in maintaining wakefulness (Saper et al., 2005) and also participate in the regulation of diurnal oscillations of extracellular A β (Kang et al., 2009). Thus, sleep loss and orexin infusion have shown to disrupt the diurnal rhythm of A β oscillation, leading to increased A β burden. Both scenarios were reversed with the infusion of a dual orexin receptor antagonist (Kang et al., 2009). Interestingly, overexpression of orexin in transgenic mice resulted in reduction of REM sleep and non-REM sleep fragmentation (Makela et al., 2010; Mieda et al., 2004), the two sleep markers featuring aMCI (Hita-Yañez et al., 2012). Finally, aging-related sleep-wake instability produced increased ER stress and ER dyshomeostasis in orexinergic and noradrenergic wake neurons (Naidoo et al., 2011). Therefore, aging, high A β levels and poor sleep quality are elements that in combination may trigger a positive feedback loop that would ultimately facilitate the progression of AD.

Relationship between impaired sleep and cortical loss in aMCI subjects

We found that reduced REM sleep in aMCI subjects was significantly associated with thinning of the bilateral postcentral gyrus, left posterior cingulate, and left precuneus. Although the two first associations were maintained when A β_{40} and A β_{42} concentrations were added to the statistical model, correlation with the left precuneus was missed. Accordingly, the strength of the association between REM duration and cortical loss in aMCI is largely independent of plasma A β levels in the postcentral gyrus and posterior cingulate, but partially dependent on A β levels in the left precuneus. Involved regions are of particular interest because they have shown GM loss in early stages of AD, as confirmed in the current study. Thus, aMCI subjects showed thinning of precuneus (corrected results) that was extended to anterior and posterior cingulate cortex (uncorrected results) when both groups were matched in age-gender (Fig. SM1).

Additional studies have revealed significant atrophy of the posterior cingulate cortex in MCI subjects (Chetelat et al., 2002), even in the absence of damage in the anterior cingulate cortex, suggesting that it is not merely a marker of global cortical atrophy associated with incipient neurodegeneration (Pengas et al., 2010). Regarding the precuneus, evidence suggests that this region is more vulnerable to the accumulation of A β plaques during the course of disease (Driscoll et al., 2012; Rowe et al., 2007), which may account for its atrophy (Apostolova et al., 2007; Spulber et al., 2012; see also group differences in cortical thickness showed in the Supplementary Material 1) and significant hypometabolism in MCI subjects (Morbelli et al., 2010), as well as for the relationship between increased plasma A β levels and cortical thinning observed in the present study. The precuneus also suffers from connectivity disruptions in non-demented older individuals with increased amyloid burden, pointing to a particular susceptibility of this cortical area to early neurodegeneration and functional disconnection in MCI subjects (Drzezga et al., 2011). Finally, cortical thinning of the postcentral gyrus has recently been associated with APOE- ϵ 4 and microtubule-associated protein tau (MAPT-H1) genetic variants in older adults with aMCI (Goñi et al., 2013), and has been further correlated with aberrant patterns of thalamic functional connectivity in MCI and AD patients (Zhou et al., 2013). Both genetic susceptibility and disrupted connectivity suggest that the loss of integrity of the postcentral gyrus might also signal early stages of neurodegeneration.

Shortening of REM sleep observed in aMCI subjects may arise in response to the vulnerability of brainstem neurons involved in REM sleep generation to AD pathology. Accordingly, neurons of the pedunculopontine and laterodorsal tegmentum, essential for the generation of REM sleep, have shown morphological changes in AD brains (Giess and Schlote, 1995; Mufson et al., 1988; Terry and Katzman, 1983). These neurons send cholinergic projections to the nucleus basalis of Meynert (Thakkar et al., 1996; Webster and Jones, 1988), considered as the major source of cholinergic innervation for the entire cortical mantle (Mesulam and Geula, 1988). The basal

forebrain cholinergic territories and their cortical projections not only are significantly affected in AD patients (Arendt et al., 1985; McGeer et al., 1984; Teipel et al., 2011; Vogels et al., 1990; Whitehouse et al., 1981), but also have shown decreased volume in aMCI subjects that was further associated with impaired recall (Grothe et al., 2010). Therefore, it might happen that REM deficits observed in aMCI could indicate the level of AD pathology in the basal forebrain cholinergic system, decreasing the number of cholinergic fibers to targeted cortical regions, which in turn could result in loss of cortical function and anatomical integrity.

In agreement with this hypothesis, the posterior cingulate and the precuneus are both targets of a progressive reduction in cortical acetylcholinesterase-rich fibers from normal aging to AD (Geula and Mesulam, 1989) and of the widest range of AD lesions (Brun and Englund, 1981). Furthermore, nicotinic cholinergic binding has been shown to be significantly reduced both in the nucleus basalis of Meynert (Araujo et al., 1988; Shimohama et al., 1986) and in the postcentral gyrus (London et al., 1989) of AD patients, providing a plausible explanation for the relationship between thinning of postcentral gyrus and shortened REM sleep in aMCI subjects.

Associations between plasma A β levels and cortical loss in aMCI subjects

Aberrant APP metabolism leading to aggregation of soluble A β_{40} and A β_{42} oligomers has largely been considered the primary trigger for the development of AD (Selkoe, 1994). Previous studies have assessed relationships between CSF A β_{42} levels and GM atrophy in MCI subjects (Desikan et al., 2010; Fjell et al., 2010; Herukka et al., 2008; Vemuri et al., 2009), although only one of these studies used aMCI (Vemuri et al., 2009) whereas none of them combined plasma A β_{42} levels with cortical thickness in the same study. Here, we found in aMCI subjects that increased plasma levels of A β_{40} and A β_{42} were related to thinning of posterior cingulate and entorhinal cortex, respectively; both structures considered canonical AD regions. While the former relationship was independent of sleep deficits, the latter vanished when REM duration was added to the statistical model. The influence of REM sleep on thinning of the right entorhinal cortex was later confirmed, when the regression analysis was limited to this region.

In line with these findings, previous evidence has shown that insoluble A β_{42} extracted from entorhinal cortex is correlated with density of neuritic plaques as well as with the Braak stage (Forman et al., 2007). Furthermore, MCI subjects have shown fewer neurons in the entorhinal cortex than HO subjects, decreasing the number of neurons in layer II by 60% and in layer IV by 40% (Gomez-Isla et al., 1996). Our study further showed that decreased REM sleep significantly contributed to correlations between A β_{42} levels and thinning of the entorhinal cortex in aMCI subjects, suggesting that both REM deficits and elevated plasma A β_{42} levels might signal incipient damage of the entorhinal cortex in older adults at risk for AD. This finding strengthens the hypothesis that REM loss might facilitate and/or accompany lesions of canonical AD regions involved in early neurodegeneration. Furthermore, recent evidence suggests that sleep improves A β clearance (Xie et al., 2013), a biological function that might be significantly altered in aMCI subjects due to the presence of sleep disturbances (Geda et al., 2004; Hita-Yañez et al., 2012; Lee et al., 2008; Westerberg et al., 2012). Thus, sleep deficits might lead to accumulation of A β oligomers and amyloid depositions, as a consequence of failures in the mechanisms to remove these neurotoxic products that accumulate in the brain during wakefulness (Bateman et al., 2007; Huang et al., 2012; Kang et al., 2009).

Although originally unexpected, we also found significant correlations between plasma A β_{40} levels and thinning of the posterior cingulate. This finding might indicate that highly amyloidogenic A β species, such as A β_{42} , are not necessarily more neurotoxic than a less or non-amyloidogenic A β species, such as A β_{40} .

Whether plasma A β levels are useful markers of brain amyloidosis remains controversial to date (Hampel et al., 2011; Koyama et al.,

2012; Rissman et al., 2012; Takeda et al., 2010). While some studies have found correlations between plasma A β levels and dementia risk and/or disease progression (Mayeux et al., 2003; Schupf et al., 2008; van Oijen et al., 2006), such findings are largely inconsistent (Fukumoto et al., 2003; Hansson et al., 2010; Roher et al., 2009). Our study confirms that plasma A β_{40} levels (van Oijen et al., 2006) and A β_{42} (Mayeux et al., 2003; Schupf et al., 2008) are significantly higher in aMCI than in HO subjects. However, we failed to establish group differences in the A β_{42} /A β_{40} ratio, despite this ratio showed a better diagnostic performance when compared with plasma A β_{42} alone (Fei et al., 2011). Although the lack of significant results with the A β ratio could be due to the small sample and/or the possible heterogeneity of our aMCI sample, it could also be linked to the cross-sectional nature of our study design. The latter explanation is supported by previous evidence showing that the A β_{42} /A β_{40} ratio was helpful in identifying cognitively normal subjects who were at increased risk of developing either MCI or AD (Graff-Radford et al., 2007).

Study limitations

This study has several limitations that need mentioning. Firstly, evidence suggests that sleep respiratory breathing disorders appear more frequently in MCI than in HO subjects (Bombois et al., 2010). Furthermore, sleep respiratory abnormalities have been observed in 50% of the subjects older than 65 years even in the absence of obstructive sleep apnea syndrome symptoms (Pavlova et al., 2008). Although we were unable to exclude the presence of sleep respiratory breathing disorders in our aMCI sample on the basis of conventional PSG recordings, it might be valuable to mention that all participants and their bed partners reported no related complaints or previous history of these disorders during the neurologic exploration. Furthermore, subjective levels of daytime sleepiness didn't differ between HO and aMCI subjects, individual ESS scorings were in all cases below the cut off for suspecting sleep disorders associated with excessive daytime sleepiness, and they were unrelated to either cognitive or sleep/wake variables assessed in our study. Nevertheless, further PSG studies including polygraphic respiratory measures are needed to determine whether altered sleep patterns and reductions in GM reported in aMCI subjects have a neurodegenerative basis or, in contrast, are due to exacerbated sleep respiratory breathing disorders (Canessa et al., 2011; Macey et al., 2002).

Secondly, the sample size employed in this study was small and lacked *in vivo* markers of AD pathology (i.e., CSF A β -tau and/or amyloid-PET). Further research with larger populations including the above markers is required to increase the generalizability of our results and to put them in context of AD.

Finally, significant relationships between sleep parameters and cortical thickness were based on vertex-wise statistical analyses implemented in general linear models. Therefore, conclusions were mainly grounded in correlations, impeding us to establish a causal relationship between the different markers evaluated. For a better understanding of interactions between plasma A β levels, sleep disturbances and loss of cortical integrity in early stages of neurodegeneration, future investigations should be aimed at determining the direction of influence between these markers by modelling interactions between them.

Conclusions

The present study shows that increased plasma A β_{42} levels are significantly associated with fragmented SWS in aMCI subjects, suggesting that sleep disruptions may signal A β burden in persons at increased risk for AD. We further showed that both reduced REM sleep and plasma A β levels in aMCI subjects were significantly related to thinning of cortical regions targeted by AD neuropathology. Collectively, these results provide a preliminary link between altered sleep physiology, increased plasma A β levels and cortical thinning in older adults with aMCI. Future research with larger cohorts including CSF and/or PET-amyloid

imaging markers is required to confirm that associations reported in the present study are reflective of cerebral A β pathology featuring early neurodegeneration.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.05.027>.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2011-25463, PSI2011-24922), the Regional Ministry of Innovation, Science and Enterprise, Junta de Andalucía (P12-CTS-2327), and CIBERNED (CB06/05/1111).

References

- American Sleep Disorder Association, 1992. EEG arousals: scoring rules and examples. *Sleep* 15, 173–184.
- Apostolova, L.G., Steiner, C.A., Akopyan, G.G., Dutton, R.A., Hayashi, K.M., Toga, A.W., Cummings, J.L., Thompson, P.M., 2007. Three-dimensional gray matter atrophy mapping in mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 64, 1489–1495.
- Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Robitaille, Y., Gauthier, S., Quirion, R., 1988. Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 50, 1914–1923.
- Arendt, T., Bigl, V., Tenstedt, A., Arendt, A., 1985. Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neurofibrillary plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 14, 1–14.
- Bateman, R.J., Wen, G., Morris, J.C., Holtzman, D.M., 2007. Fluctuations of CSF amyloid-beta levels: implications for a diagnostic and therapeutic biomarker. *Neurology* 68, 666–669.
- Bernal-Rusiel, J.L., Atienza, M., Cantero, J.L., 2008. Detection of focal changes in human cortical thickness: spherical wavelets versus Gaussian smoothing. *NeuroImage* 41, 1278–1292.
- Bernal-Rusiel, J.L., Atienza, M., Cantero, J.L., 2010. Determining the optimal level of smoothing in cortical thickness analysis: a hierarchical approach based on sequential statistical thresholding. *NeuroImage* 52, 158–171.
- Böhm, P., Peña-Casanova, J., Aguilar, M., Hernandez, G., Sol, J.M., Blesa, R., NORMACODEN Group, 1998. Clinical validity and utility of the interview for deterioration of daily living in dementia for Spanish-speaking communities. *Int. Psychogeriatr.* 10, 261–270.
- Bombois, S., Derambure, P., Pasquier, F., Monaca, C., 2010. Sleep disorders in aging and dementia. *J. Nutr. Health Aging* 14, 212–217.
- Brun, A., Englund, E., 1981. Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology* 5, 549–564.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., Glabe, C., 1992. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A β /beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546–554.
- Canessa, N., Castronovo, V., Cappa, S.F., Aloia, M.S., Marelli, S., Falini, A., Alemanno, F., Ferini-Strambi, L., 2011. Obstructive sleep apnea: brain structural changes and neurocognitive function before and after treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1419–1426.
- Chafekar, S.M., Zwart, R., Veerhuis, R., Vanderstichele, H., Baas, F., Scheper, W., 2008. Increased A β 1–42 production sensitizes neuroblastoma cells for ER stress toxicity. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 469–474.
- Chetelat, G., Desgranges, B., de la Sayette, V., Viader, F., Eustache, F., Baron, J.C., 2002. Mapping gray matter loss with voxel-based morphometry in mild cognitive impairment. *Neuroreport* 13, 1939–1943.
- Chetelat, G., Villemagne, V.L., Pike, K.E., Ellis, K.A., Bourgeat, P., Jones, G., O'Keefe, G.J., Salvado, O., Szoeke, C., Martins, R.N., Ames, D., Masters, C.L., Rowe, C.C., Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Study of ageing (AIBL) Research Group, 2011. Independent contribution of temporal beta-amyloid deposition to memory decline in the pre-dementia phase of Alzheimer's disease. *Brain* 134, 798–807.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H., 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79–84.
- Dale, A.M., Fischl, B., Sereno, M.I., 1999. Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *NeuroImage* 9, 179–194.
- Desikan, R.S., Sabuncu, M.R., Schmansky, N.J., Reuter, M., Cabral, H.J., Hess, C.P., Weiner, M. W., Biffl, A., Anderson, C.D., Rosand, J., Salat, D.H., Kemper, T.L., Dale, A.M., Sperling, R. A., Fischl, B., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Selective disruption of the cerebral neocortex in Alzheimer's disease. *PLoS One* 5 (9), e12853.
- Driscoll, I., Davatzikos, C., An, Y., Wu, X., Shen, D., Kraut, M., Resnick, S.M., 2009. Longitudinal pattern of regional brain volume change differentiates normal aging from MCI. *Neurology* 72, 1906–1913.
- Driscoll, I., Troncoso, J.C., Rudow, G., Sojkova, J., Pletnikova, O., Zhou, Y., Kraut, M.A., Ferrucci, L., Mathis, C.A., Klunk, W.E., O'Brien, R.J., Davatzikos, C., Wong, D.F., Resnick, S.M., 2012. Correspondence between *in vivo* (11C)-PIB-PET amyloid imaging and postmortem, region-matched assessment of plaques. *Acta Neuropathol.* 124, 823–831.
- Drzezga, A., Becker, J.A., Van Dijk, K.R., Sreenivasan, A., Talukdar, T., Sullivan, C., Schultz, A.P., Sepulcre, J., Putcha, D., Greve, D., Johnson, K.A., Sperling, R.A., 2011. Neuronal dysfunction and disconnection of cortical hubs in non-demented subjects with elevated amyloid burden. *Brain* 134, 1635–1646.

- Fazekas, F., Chawluk, J.B., Alavi, A., Hurtig, H.J., Zimmerman, R.A., 1987. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *Am. J. Roentgenol.* 149, 351–356.
- Fei, M., Jianghua, W., Wujuan, M., Wei, Z., Qian, W., 2011. The relationship of plasma A β levels to dementia in aging individuals with mild cognitive impairment. *J. Neurol. Sci.* 305, 92–96.
- Fischl, B., Dale, A.M., 2000. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11050–11055.
- Fischl, B., Sereno, M.I., Dale, A.M., 1999a. Cortical surface-based analysis. II: Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *NeuroImage* 9, 195–207.
- Fischl, B., Sereno, M.I., Tootell, R.B., Dale, A.M., 1999b. High-resolution intersubject averaging and a coordinate system for the cortical surface. *Hum. Brain Mapp.* 8, 272–284.
- Fischl, B., Liu, A., Dale, A.M., 2001. Automated manifold surgery: constructing geometrically accurate and topologically correct models of the human cerebral cortex. *IEEE Trans. Med. Imaging* 20, 70–80.
- Fjell, A.M., Walhovd, K.B., Fennema-Notestine, C., McEvoy, L.K., Hagler, D.J., Holland, D., Brewer, J.B., Dale, A.M., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. CSF biomarkers in prediction of cerebral and clinical change in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 30, 2088–2101.
- Forman, M.S., Mufson, E.J., Leurgans, S., Pratico, D., Joyce, S., Leigh, S., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2007. Cortical biochemistry in MCI and Alzheimer disease: lack of correlation with clinical diagnosis. *Neurology* 68, 757–763.
- Forsberg, A., Engler, H., Almkvist, O., Blomquist, G., Hagman, G., Wall, A., Ringheim, A., Långström, B., Nordberg, A., 2008. PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 29, 1456–1465.
- Fukumoto, H., Tennis, M., Locascio, J.J., Hyman, B.T., Growdon, J.H., Irizarry, M.C., 2003. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch. Neurol.* 60, 958–964.
- Geda, Y.E., Smith, G.E., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Tangalos, E.G., Ivnik, R.J., Mrazek, D.A., Eklund, S.D., Petersen, R.C., 2004. De novo genesis of neuropsychiatric symptoms in mild cognitive impairment (MCI). *Int. Psychogeriatr.* 16, 51–60.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1989. Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study. *Neuroscience* 33, 469–481.
- Giess, R., Schöte, W., 1995. Localisation and association of pathomorphological changes at the brainstem in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 84, 209–226.
- Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel, Jr., D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T., 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 4491–4500.
- Goñi, J., Cervantes, S., Arrondo, G., Lamet, I., Pastor, P., Pastor, M.A., 2013. Selective brain gray matter atrophy associated with APOE ϵ 4 and MAPT H1 in subjects with mild cognitive impairment. *J. Alzheimers Dis.* 33, 1009–1019.
- Graf, Radford, N.R., Crook, J.E., Lucas, J., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Younkin, L.H., Petersen, R.C., Younkin, S.G., 2007. Association of low plasma A β 24/42/A β 40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 64, 354–362.
- Greiner, S., Schleicher, A., Zilles, K., 1999. Areas 3a, 3b, and 1 of human primary somatosensory cortex. *NeuroImage* 10, 63–83.
- Grothe, M., Zaborszky, L., Aizen, M., Gil-Neciga, E., Rodriguez-Romero, R., Teipel, S.J., Amunts, K., Suarez-Gonzalez, A., Cantero, J.L., 2010. Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* 20, 1685–1695.
- Hampel, H., Wilcock, G., Andrieu, S., Aisen, P., Blennow, K., Broich, K., Carrillo, M., Fox, N.C., Frisoni, G.B., Isaac, M., Lovestone, S., Nordberg, A., Prulovic, D., Sampaio, C., Scheltens, P., Weiner, M., Winblad, B., Coley, N., Velas, B., Oxford Task Force Group, 2011. Biomarkers for Alzheimer's disease therapeutic trials. *Prog. Neurobiol.* 95, 579–593.
- Hänggi, J., Streffer, J., Jäncke, L., Hock, C., 2011. Volumes of lateral temporal and parietal structures distinguish between healthy aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 26, 719–734.
- Hansson, O., Zetterberg, H., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Andreasson, U., Londos, E., Wallin, A., Minthon, L., Blennow, K., 2010. Evaluation of plasma A β (40) and A β (42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 31, 357–367.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Haroutunian, V., Perl, D.P., Purohit, D.P., Marin, D., Khan, K., Lantz, M., Davis, K.L., Mohs, R. C., 1998. Regional distribution of neuritic plaques in the nondemented elderly and subjects with very mild Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 55, 1185–1195.
- Herukka, S.K., Pannanen, C., Soironen, H., Pirttilä, T., 2008. CSF A β 242, tau and phosphorylated tau correlate with medial temporal lobe atrophy. *J. Alzheimers Dis.* 14, 51–57.
- Hita-Ñañez, E., Aizen, M., Gil-Neciga, E., Cantero, J.L., 2012. Disturbed sleep patterns in elders with mild cognitive impairment: the role of memory decline and APOE ϵ 4 genotype. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 290–297.
- Hita-Ñañez, E., Aizen, M., Cantero, J.L., 2013. Polysomnographic and subjective sleep markers of mild cognitive impairment. *Sleep* 36, 1327–1334.
- Huang, Y., Potter, R., Sigurdson, W., Santacruz, A., Shih, S., Ju, Y.E., Kasten, T., Morris, J.C., Mintun, M., Duntley, S., Bateman, R.J., 2012. Effects of age and amyloid deposition on A β dynamics in the human central nervous system. *Arch. Neurol.* 69, 51–58.
- Hughes, C.P., Berg, L., Danziger, W.L., 1982. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br. J. Psychiatry* 140, 566–572.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y., 1994. Visualization of A β 242(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 242(43). *Neuron* 13, 45–53.
- Johns, M.W., 1991. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14, 540–545.
- Kang, J.E., Lim, M.M., Bateman, R.J., Lee, J.J., Smyth, L.P., Cirrito, J.R., Fujiki, N., Nishino, S., Holtzman, D.M., 2009. Amyloid- β dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science* 326, 1005–1007.
- Kemppainen, N.M., Aalto, S., Wilson, I.A., Nägren, K., Helin, S., Brück, A., Oikonen, V., Kallajärvi, M., Scheinin, M., Viitanen, M., Parkkola, R., Rinne, J.O., 2007. PET amyloid ligand [¹¹C]PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1603–1606.
- Kim, I., Xu, W., Reed, J.C., 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 1013–1030.
- Koyama, A., Okereke, O.I., Yang, T., Blacker, D., Selkoe, D.J., Grodstein, F., 2012. Plasma amyloid- β as a predictor of dementia and cognitive decline: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Neurol.* 69, 824–831.
- Kuperberg, G.R., Broome, M.R., McGuire, P.K., David, A.S., Eddy, M., Ozawa, F., Goff, D., West, W.C., Williams, S.C., Van der Kouwe, A.J., Salat, D.H., Dale, A.M., Fischl, B., 2003. Regionally localized thinning of the cerebral cortex in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 878–888.
- Lee, K.S., Cho, H.S., Hong, C.H., Kim, D.G., Oh, B.H., 2008. Differences in neuropsychiatric symptoms according to mild cognitive impairment subtypes in the community. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 26, 212–217.
- Lobo, A., Escoba, V., Exquerra, J., Sevar-Diaz, A., 1979. Mini-Examen Cognoscitivo: Un test sencillo, práctico, para detectar alteraciones intelectuales en pacientes psiquiátricos. *Actas Luso Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines* 3, 189–202.
- Loewenstein, R.J., Weingartner, H., Gillin, J.C., Kaye, W., Ebert, M., Mendelson, W.B., 1982. Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia. *Neurobiol. Aging* 3, 371–377.
- London, E.D., Ball, M.J., Waller, S.B., 1989. Nicotinic binding sites in cerebral cortex and hippocampus in Alzheimer's dementia. *Neurochem. Res.* 14, 745–750.
- Macey, P.M., Henderson, L.A., Macey, K.E., Alger, J.R., Frysinger, R.C., Woo, M.A., Harper, R. K., Yan-Go, F.L., Harper, R.M., 2002. Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1382–1387.
- Makela, K.A., Wigren, H.K., Zant, J.C., Sakurai, T., Alhonen, L., Kostin, A., Porkka-Heiskanen, T., Herzig, K.H., 2010. Characterization of sleep-wake patterns in a novel transgenic mouse line overexpressing human prepro-orexin/hypocretin. *Acta Physiol. (Oxf.)* 198, 237–249.
- Mayeux, R., Honig, L.S., Tang, M.X., Manly, J., Stern, Y., Schupf, N., Mehta, P.D., 2003. Plasma A β 40 and A β 42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 61, 1185–1190.
- McDonald, B., Highley, J.R., Walker, M.A., Herron, B.M., Cooper, S.J., Esiri, M.M., Crow, T.J., 2000. Anomalous asymmetry of fusiform and parahippocampal gyrus gray matter in schizophrenia: A postmortem study. *Am. J. Psychiatry* 157, 40–47.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., Suzuki, J., Dolman, C.E., Nagai, T., 1984. Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system of the basal forebrain. *Neurology* 34, 741–745.
- Mesulam, M.M., Geula, C., 1988. Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* 275, 216–240.
- Mieda, M., Willie, J.T., Hara, J., Sinton, C.M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., 2004. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4649–4654.
- Moe, K.E., Vitiello, M.V., Larsen, L.H., Prinz, P.N., 1995. Cognitive processes and sleep disturbances: Sleep/wake patterns in Alzheimer's disease: relationships with cognition and function. *J. Sleep Res.* 4, 15–20.
- Morbelli, S., Piccardo, A., Villavechia, G., Dessi, B., Brugnolo, A., Piccini, A., Caroli, A., Frisoni, G., Rodriguez, G., Nobili, F., 2010. Mapping brain morphological and functional conversion patterns in amnesic MCI: a voxel-based MRI and FDG-PET study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Biol.* 37, 36–45.
- Mufson, E.J., Mash, D.C., Hersh, L.B., 1988. Neurofibrillary tangles in cholinergic pedunclopontine neurons in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 24, 623–629.
- Naidoo, N., 2012. Roles of endoplasmic reticulum and energetic stress in disturbed sleep. *Neuromolecular Med.* 14, 213–219.
- Naidoo, N., Ferber, M., Master, M., Zhu, Y., Pack, A.I., 2008. Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *J. Neurosci.* 28, 6539–6548.
- Naidoo, N., Zhu, Y., Fenik, P., Lian, J., Galante, R., Veasey, S., 2011. Endoplasmic reticulum stress in wake-active neurons progresses with aging. *Aging Cell* 10, 640–649.
- Nishitsuji, K., Tomiyama, T., Ishibashi, K., Ito, K., Teraoka, R., Lambert, M.P., Klein, W.L., Mori, H., 2009. The E693Delta mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid β oligomers and causes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in cultured cells. *Am. J. Pathol.* 174, 957–969.
- Pavlova, M.K., Duffy, J.F., Shea, S.A., 2008. Polysomnographic respiratory abnormalities in asymptomatic individuals. *Sleep* 31, 241–248.
- Pengas, G., Hodges, J.R., Watson, P., Nestor, P.J., 2010. Focal posterior cingulate atrophy in incipient Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 31, 25–33.
- Petersen, P.R., Smith, G.E., Waring, S.C., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., Kokmen, E., 1999. Mild cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 56, 303–308.
- Prinz, P.N., Vitaliano, P.P., Vitiello, M.V., Bokan, J., Raskind, M., Peskind, E., Gerber, C., 1982. Sleep, EEG and mental function changes in senile dementia of the Alzheimer's type. *Neurobiol. Aging* 3, 361–370.
- Rechtschaffen, A., Kales, A., 1968. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. UCLA Brain Information Service/Brain Research Institute, Los Angeles, California.
- Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R., 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 137–152.
- Rissman, R.A., Trojanowski, J.Q., Shaw, L.M., Aisen, P.S., 2012. Longitudinal plasma amyloid beta as a biomarker of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 119, 843–850.

- Roh, J.H., Huang, Y., Bero, A.W., Kasten, T., Stewart, F.R., Bateman, R.J., Holtzman, D.M., 2012. Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of β -amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. *Sci. Transl. Med.* 4 (150ra122).
- Roher, A.E., Maarouf, C.L., Sue, L.I., Hu, Y., Wilson, J., Beach, T.G., 2009. Proteomic-derived cerebrospinal fluid markers of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Biomarkers* 14, 493–501.
- Rosas, H.D., Liu, A.K., Hersch, S., Glessner, M., Ferrante, R.J., Salat, D.H., van der Kouwe, A., Jenkins, B.G., Dale, A.M., Fischl, B., 2002. Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. *Neurology* 58, 695–701.
- Rowe, C.C., Ng, S., Ackermann, U., Gong, S.J., Pike, K., Savage, G., Cowie, T.F., Dickinson, K.L., Maruff, P., Darby, D., Smith, C., Woodward, M., Merory, J., Tochon-Danguy, H., O'Keefe, G., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Price, J.C., Masters, C.L., Villemagne, V.L., 2007. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* 68, 1718–1725.
- Sabbagh, M.N., Cooper, K., DeLange, J., Stoehr, J.D., Thind, K., Lahti, T., Reisberg, B., Sue, L., Vedders, L., Fleming, S.R., Beach, T.G., 2010. Functional, global and cognitive decline correlates to accumulation of Alzheimer's pathology in MCI and AD. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 280–286.
- Salat, D.H., Buckner, R.L., Snyder, A.Z., Greve, D.N., Desikan, R.S., Busa, E., Morris, J.C., Dale, A.M., Fischl, B., 2004. Thinning of the cerebral cortex in aging. *Cereb. Cortex* 14, 721–730.
- Saper, C.B., Scammell, T.E., Lu, J., 2005. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437, 1257–1263.
- Scheperjans, F., Eickhoff, S.B., Hömke, H., Mohlberg, K., Hermann, K., Amunts, K., Zilles, K., 2008. Probabilistic maps, morphometry, and variability of citoarchitectonic areas in the human superior parietal cortex. *Cereb. Cortex* 18, 2141–2157.
- Schupf, N., Tang, M.X., Fukuyama, H., Manly, J., Andrews, H., Mehta, P., Ravetch, J., Mayeux, R., 2008. Peripheral Abeta subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14052–14057.
- Segonne, F., Dale, A.M., Busa, E., Glessner, M., Salat, D., Hahn, H.K., Fischl, B., 2004. A hybrid approach to the skull stripping problem in MRI. *Neuroimage* 22, 1060–1075.
- Selkoe, D.J., 1994. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489–517.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiwara, M., Kameyama, M., 1986. Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *J. Neurochem.* 46, 288–293.
- Spulber, G., Niskanen, E., Macdonald, S., Kivipelto, M., Padilla, D.F., Julkunen, V., Hallikainen, M., Vanninen, R., Wahlund, L.O., Soininen, H., 2012. Evolution of global and local grey matter atrophy on serial MRI scans during the progression from MCI to AD. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 516–524.
- Stephan, A., Laroche, S., Davis, S., 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J. Neurosci.* 21, 5703–5714.
- Takahashi, K., Niidome, T., Akaike, A., Kihara, T., Sugimoto, H., 2009. Amyloid precursor protein promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell death via C/EBP homologous protein-mediated pathway. *J. Neurochem.* 109, 1324–1337.
- Takeda, S., Sato, N., Raktugi, H., Morishita, R., 2010. Plasma beta-amyloid as potential biomarker of Alzheimer disease: possibility of diagnostic tool for Alzheimer disease. *Mol. Biosyst.* 6, 1760–1766.
- Teipel, S.J., Meindl, T., Grinberg, L., Grothe, M., Cantero, J.L., Reiser, M.F., Möller, H.J., Heinsen, H., Hampel, H., 2011. The cholinergic system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: An in vivo MRI and DTI study. *Hum. Brain Mapp.* 32, 1349–1362.
- Terry, R.D., Katzman, R., 1983. Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 14, 497–506.
- Thakkar, M., Portas, C., McCarley, R.W., 1996. Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Res.* 723, 223–227.
- Tranah, G.J., Blackwell, T., Stone, K.L., Ancoli-Israel, S., Paudel, M.L., Ensrud, K.E., Cauley, J.A., Redline, S., Hillier, T.A., Cummings, S.R., Yaffe, K., SOF Research Group, 2011. Circadian activity rhythms and risk of incident dementia and mild cognitive impairment in older women. *Ann. Neurol.* 70, 722–732.
- Umeda, T., Tomiyama, T., Sakama, N., Tanaka, S., Lambert, M.P., Klein, W.L., Mori, H., 2011. Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J. Neurosci.* 31, 1031–1042.
- Van Essen, D.C., Drury, H.A., Joshi, S., Miller, M.L., 1998. Functional and structural mapping of human cerebral cortex: solutions are in the surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 788–795.
- van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H.D., Koudstaal, P.J., Breteler, M.M., 2006. Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol.* 5, 655–660.
- Vemuri, P., Wiste, H.J., Weigand, S.D., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Weiner, M.W., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Jack Jr., C.R., 2009. Alzheimer's disease neuroimaging initiative. MRI and CSF biomarkers in normal, MCI, and AD subjects: diagnostic discrimination and cognitive correlations. *Neurology* 73, 287–293.
- Vitiello, M.V., Prinz, P.N., Williams, D.E., Frommlet, M.S., Ries, R.K., 1990. Sleep disturbances in patients with mild-stage Alzheimer's disease. *J. Gerontol.* 45, 131–138.
- Vogels, O.J., Broere, C.A., ter Laak, H.J., ten Donkelaar, H.J., Nieuwenhuys, R., Schulte, B.P., 1990. Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 11, 3–13.
- Walter, P., Ron, D., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086.
- Webster, H.H., Jones, B.E., 1988. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res.* 458, 285–302.
- Wechsler, D., 2004. *WMS-III. Wechsler Memory Scale-III: Application and scoring manual*. Madrid, TEA Ediciones.
- Westerberg, C.E., Mander, B.A., Florczak, S.M., Weintraub, S., Mesulam, M.M., Zee, P.C., Paller, K.A., 2012. Concurrent impairments in sleep and memory in amnesic mild cognitive impairment. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 18, 490–500.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T., DeLong, M.R., 1981. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10, 122–126.
- Whitwell, J.L., Przybelski, S.A., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Petersen, R.C., Jack Jr., C.R., 2007. 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* 130, 1777–1786.
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Liff, J.J., Takano, T., Deane, R., Nedergaard, M., 2013. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342, 373–377.
- Yaffe, K., Laffan, A.M., Harrison, S.L., Redline, S., Spira, A.P., Ensrud, K.E., Ancoli-Israel, S., Stone, K.L., 2011. Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *J. Am. Med. Assoc.* 306, 613–619.
- Yesavage, J.A., Brink, T.L., Rose, T.L., Lum, O., 1983. Development and validation of a geriatric depression scale: a preliminary report. *J. Psychiatry Res.* 17, 37–49.
- Zhou, B., Liu, Y., Zhang, Z., An, N., Yao, H., Wang, P., Wang, L., Zhang, X., Jiang, T., 2013. Impaired functional connectivity of the thalamus in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a resting-state fMRI study. *Curr. Alzheimer Res.* 10, 754–766.

Sleep mediates the association between homocysteine and oxidative status in mild cognitive impairment

Mayely P. Sanchez-Espinosa, Mercedes Atienza, Jose L. Cantero*

Laboratory of Functional Neuroscience, Spanish Network of Excellence for Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Pablo de Olavide University, Seville, Spain

*Address correspondence to: Jose L. Cantero, Ph.D.; Laboratory of Functional Neuroscience; Pablo de Olavide University, Ctra. de Utrera Km 1, 41013 – Seville, (SPAIN); Phone: +34 954 977433; E-mail: jlcanlor@upo.es

ABSTRACT

Tremendous progress has been made over the few last years in understanding how sleep and amyloid- β ($A\beta$) interact to speed up the progression of Alzheimer's disease (AD). However, there remains the question of whether sleep interacts with other risk factors that exacerbate the pathological cascade of AD. Based on evidence showing that increased levels of homocysteine (HCY) and poor sleep produce oxidative damage leading to brain atrophy, we here investigate whether the relationship between HCY and total antioxidant capacity (TAC) is mediated by sleep in healthy older (HO, N=21) adults and mild cognitive impairment (MCI, N=21). We show that reduced TAC in MCI was significantly correlated with increased HCY, shortened sleep duration, decreased sleep efficiency, and gray matter (GM) loss in the temporal lobe. However, only the HCY-TAC association distinguished MCI from HO, and this relationship was mediated by sleep. Finally, we demonstrate that HCY-related GM loss in MCI depends on the serial relationship between poor sleep and decreased TAC levels. These findings provide novel insights into how impaired sleep may contribute to self-perpetuating the relationship between HCY and oxidative stress in prodromal AD, and offer empirical foundations to weaken this link based on interventions aimed at counteracting these factors.

INTRODUCTION

One of the hallmarks of aging is the pervasive accumulation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) followed by the decreased ability of cells to defend against and recover from oxidative insults¹. Age-induced alteration of the cellular oxidative environment disrupts the homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER), resulting in accumulation and aggregation of unfolded proteins, which in turn lead to a condition referred to as ER stress². Given that age-related oxidative stress and impaired cellular stress adaptation increases the vulnerability of neurons to degeneration³, it is hardly surprising that mitochondrial dysfunction, impaired antioxidant enzymatic activity, and ROS overproduction are among the earliest events in Alzheimer's disease (AD)⁴. Indeed, patients with mild cognitive impairment (MCI), considered the prodromal stage of AD, already show signatures of oxidative damage in both brain tissue⁵ and in the blood stream⁶.

Previous studies suggest that other markers of MCI/AD, such as homocysteine (HCY)⁷ and sleep⁸, may also exacerbate oxidative stress and AD pathology. Thus, elevated levels of HCY have been shown to affect redox signaling pathways in neuronal cells⁹ and instigate A β aggregation¹⁰, likely accounting for HCY-related cerebral atrophy patterns observed in prodromal AD¹¹. On the other hand, sleep loss has been associated with ROS-induced oxidative stress in middle-aged flies¹², activation of a maladaptive ER stress response in old mice¹³, and A β aggregation in transgenic mouse models of amyloidosis¹⁴. However, it remains unknown whether the association between HCY and brain atrophy is determined by the intrinsic relationship between TAC and sleep. The current study seeks to address this issue by performing overnight polysomnographic (PSG) recordings, high-resolution cerebral MRI scans, and serum measures of HCY and total antioxidant capacity (TAC) in HO adults and MCI patients.

The following hypotheses motivated our approach: 1) the HCY-TAC relationship will be stronger in MCI than in HO. This assumption was based on the fact that a combined pattern of elevated HCY and decreased TAC appeared to be more specific to MCI/AD than HCY alone¹⁵, which is considered an unspecific risk factor for a variety of neurodegenerative conditions¹⁶; 2) the HCY-sleep relationship will be present in both HO and MCI, as inferred from studies showing that elevated HCY levels are more frequent in subjects with a short sleep than those with a normal sleep duration

regardless of their clinical status¹⁷; 3) MCI patients will show a stronger sleep-TAC relationship than HO as supported by evidence showing associations between shortened sleep durations and decreased TAC levels in different clinical populations^{18,19}; and 4) all these factors (i.e., HCY, TAC and sleep) will be related to each other in MCI because of their proven influence on A β accumulation, which would account for HCY-sleep associated patterns of brain atrophy^{11,20}.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Twenty-one patients with amnesic MCI (11 females, mean age: 68.7 ± 7.4 yr) and 21 cognitively healthy older (HO) subjects (10 females, mean age: 66.6 ± 5.2 yr) were enrolled in the study. Participants were primarily recruited from senior citizen's associations, memory screening programs, and hospital dementia services. Informed consent was obtained from all participants, and the Ethical Committee for Human Research at the Pablo de Olavide University approved all procedures in accordance with the declaration of Helsinki.

All participants received a neurological examination. Subjects diagnosed with amnesic MCI showed an idiopathic amnesic disorder with absence of impairment in cognitive areas other than memory, and all of them met core clinical criteria for aMCI due to AD with an intermediate level of certainty. Elderly depression was excluded based on the shortened version of the Geriatric Depression Scale (scores ≤ 5). Inclusion criteria for HO subjects were normal cognitive performance relative to appropriate reference values for age and education, Clinical Dementia Rating (CDR) global score of 0 (no dementia), and normal independent function, judged both clinically and by means of an interview for deterioration in daily living activities. None of the participants were taking cholinesterase inhibitors and/or sedative-hypnotic drugs at the time of recruiting or during the study, nor did they report sleep-disordered breathing, movement disorders during sleep, or unusual sleep schedules (e.g., shift work), as corroborated by bed partners and/or caregivers.

Measures of TAC and HCY

Overnight fasting serum samples were collected from all participants, stored at -80°C , and thawed immediately before assay. To estimate serum TAC levels, we employed an improved oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay with fluorescein as the fluorescent probe²¹. This methodology provides a direct measure of hydrophilic chain-breaking antioxidant capacity against peroxy radicals, and considers both inhibition time and inhibition percentage of free radical action in the quantification. ORAC was determined in samples without proteins by diluting the serum with 0.5 M perchloric acid and centrifuging at 4°C (14,000 rpm) for 8 minutes. The recovered supernatant was diluted 19-fold in 5mM phosphate-buffered saline. Fluorescence was measured at 37°C on a Victor X3 multilabel plate reader spectrophotometer (PerkinElmer, USA) at 485 nm and 535 nm wavelengths for excitation and emission, respectively. Trolox was used as standard, and ORAC was expressed as Trolox equivalents in micromole per litre of serum ($\mu\text{M/L}$). Final ORAC values were calculated by using a regression equation between the Trolox concentration and the net area under the fluorescein decay curve. Reactions were carried out in triplicate and coefficients of variation were below 10%. As over half of the antioxidant capacity of human blood is derived from uric acid, measures of uric acid were obtained by enzymatic methods and subtracted from ORAC values before analysis.

Serum HCY levels were also obtained from each participant using standard enzymatic methods (A15 Random Access Analyzer, Biosystems, Spain).

PSG recordings

Overnight PSG recordings were performed in a sound-attenuated bedroom with infrared video-controlled supervision. The PSG protocol included 59 EEG standard locations according to the International 10-10 System, vertical and horizontal electrooculography, and electromyography of submental muscles. Signals were filtered (0.1-100 Hz bandpass), digitized (250 Hz, 16-bit resolution), and stored for subsequent analyses (BrainAmp MR, Brain Products, Germany). A technician blind to the purpose of study scored sleep stages in accordance with standardized techniques²².

Structural MRI

Structural cerebral images were acquired on a Philips Achieva 3T MRI scanner equipped with an 8-channel head coil. T1-weighted magnetization-prepared rapid gradient echo (MP-RAGE) cerebral images were obtained for each participant. Acquisition parameters were empirically optimized for gray/white contrast (repetition-time = 2300 ms, echo-time = 4.5 ms, flip angle = 8°, matrix dimensions 320 x 320, 0.8 isotropic voxel, no gap between slices, time per acquisition = 9.1 min).

MRI data were preprocessed using the voxel-based morphometry (VBM) approach integrated in SPM12 (Wellcome Trust Center for Neuroimaging; www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm). Briefly, T1-weighted brain images were manually reoriented to the anterior commissure and further segmented into different compartments following the unified segmentation implemented in SPM12. Next, the diffeomorphic anatomical registration through an exponentiated lie algebra (DARTEL) algorithm was applied to segmented brain images. Gray matter (GM) maps were spatially normalized into the Montreal Neurological Institute (MNI) brain space, and smoothed with an isotropic Gaussian kernel of 12 mm full-width at half-maximum.

Statistical analysis

Statistical analysis of demographic variables, TAC and HCY measures, and sleep parameters were conducted in SPSS v22 (SPSS inc., USA). Gender was inspected using the Chi-square test while the remaining demographic variables were assessed with unpaired t-tests. Group differences in sleep, TAC and HCY levels were evaluated by analyses of covariance (ANCOVA) with age and gender as nuisance when they achieved statistical significance. Linear regression analyses were further conducted in each group to assess if changes in sleep and HCY were associated with variations in TAC levels, and if HCY levels helped to explain the variance in sleep. These analyses were adjusted by those demographic variables that explained a significant part of the variance in the dependent variable. If regression coefficients achieved statistical significance in at least one group, we proceeded to compare regression coefficients between the two groups.

Based on the general linear model implemented in SPM12, voxel-wise linear regression analyses were performed in each group to assess whether TAC/HCY levels predicted

changes in GM volume. Again, if the relationship reached significance in at least one group, we proceeded to evaluate group differences in the strength of correlations. These analyses were adjusted by age and gender when they achieved statistical significance. The resulting statistical maps were thresholded at $P < 0.05$ at the cluster level using the family-wise error (FEW) rate.

Path analysis was conducted to examine our initial hypothesis that sleep in MCI is a mediator of the relationship between HCY and TAC levels. The basic single mediation model is depicted as a path diagram in Figure 2A-B. Specifically, this model evaluates whether HCY levels explain changes in different sleep parameters (path β_1), which in turn are expected to account for variations in TAC (path β_2). The path c' represents the relationship between HCY and TAC after controlling for the influence of sleep. The single mediators (sleep parameters) were considered to mediate this relationship if the joint significant test (paths β_1 and β_2) and the product-of-coefficients ($\beta_1 * \beta_2$) were significantly nonzero, and if the total effect of HCY on TAC (path c) reached significance. Demographic variables were included as nuisance in the model if they explained a significant part of the variance in the mediator and/or the dependent variable. Inference was determined by 95% bias-corrected bootstrap confidence intervals from 10,000 bootstrap samples. These analyses were performed with the Andrew Hayes' *PROCESS* macro in SPSS.

If results support the idea that both increased HCY and decreased TAC are associated with GM loss in MCI, we will further test the hypothesis that the relationship between HCY and GM is mediated by the relationship between sleep and TAC. The serial multiple-mediator model used to test this hypothesis is depicted in Figure 2C.

RESULTS

Demographic, cognitive profile, sleep and blood markers

Table 1 shows mean and standard deviations for all variables included in the study for HO and MCI individuals. While both groups were statistically homogeneous in demographics, MCI patients showed lower scores in global cognitive function ($P = 0.005$), immediate ($P = 10^{-6}$) and delayed memory ($P = 10^{-8}$). As previously reported, REM sleep was significantly shortened ($P = 0.03$) and slow-wave sleep was more

disrupted ($P = 10^{-5}$) in MCI compared to HO subjects²⁰. Although both sleep duration and sleep efficiency showed a trend toward reduction in MCI, these differences did not achieve statistical significance.

TAC levels, reflected by ORAC values, were significantly decreased in MCI compared to HO ($P = 0.03$). Neither HCY levels nor the proportion of subjects with clinical HCY values ($>14 \mu\text{mol/l}$) (28.6% of controls vs. 47.6% of MCI) allowed us to distinguish the two groups, likely due to the small sample size employed in the present study.

Table 1. Demographic, cognitive, sleep, and peripheral markers.

	HO	MCI
Age, yr	67. ± 5.5	69.8 ± 6.5
Gender (F / M)	10 / 11	6 / 15
Education, yr	8.6 ± 4.3	8.2 ± 5.4
CDR (sum of boxes)	0	0.5
MMSE	28.3 ± 1.3	26.7 ± 2.5*
Immediate recall	14.2 ± 2.9	9.3 ± 2.8*
Delayed recall	13.3 ± 2.7	6.5 ± 4*
TST (min)	395.7 ± 30.7	372.6 ± 55.5
Stage 2 (%)	34.6 ± 6.9	36.3 ± 9.3
SWS (%)	23.6 ± 7	22.7 ± 12.2
REM (%)	14.1 ± 3.4	10.1 ± 4.6*
WASO (%)	13.2 ± 5.8	15.6 ± 6.2
AI Stage 2	0.31 ± 0.17	0.25 ± 0.13
AI SWS	0.05 ± 0.03	0.15 ± 0.08*
AI REM	0.18 ± 0.14	0.22 ± 0.09
Sleep efficiency (%)	83.8 ± 6.1	78.6 ± 11.5
TAC ($\mu\text{M/L}$)	440.8 ± 301.4	270.5 ± 187.5*
Homocysteine ($\mu\text{M/L}$)	14.0 ± 4.9	15.1 ± 4.7

Results are expressed as mean ± standard deviation. CDR: Clinical Dementia Rating; CDR = 0: no dementia; CDR = 0.5: questionable or very mild dementia; MMSE: Mini-Mental State Examination; TST: total sleep time; WASO: wake after sleep onset; SWS: slow-wave sleep; REM: rapid-eye movement sleep; AI: arousal index. *The statistical test for group differences reached significance ($P < 0.05$).

Group differences in GM volume

Compared to HO, MCI patients showed a significant reduction of the right hippocampus ($P_{\text{FWE-corrected}} = 0.002$; MNI coordinates of the peak voxel: [33 -11 -15]), left middle temporal gyrus ($P_{\text{FWE-corrected}} = 0.001$; [-45 -36 5]) and right inferior frontal gyrus ($P_{\text{FWE-corrected}} = 0.001$; [32 23 27]).

Relationship between HCY, TAC and sleep

We examined whether HCY and sleep parameters were associated with TAC levels in each group. Scatter plots showing these relationships for HO and MCI are shown in Figure 1. Linear regression analyses revealed that shortened sleep duration ($R^2 = 0.50$; $F_{2,18} = 8.9$; $P = 0.002$) and reduced sleep efficiency ($R^2 = 0.40$; $F_{2,18} = 6.1$; $P = 0.01$) significantly correlated with decreased TAC levels in MCI. No relationship between sleep and TAC levels was found in HO. Neither regression coefficients differed between groups.

Next, we evaluated whether HCY levels predicted changes in sleep in each group separately. Results showed that increased HCY were significantly correlated with shortened sleep duration ($R^2 = 0.56$; $F_{2,18} = 11.3$; $P = 0.001$) and reduced sleep efficiency ($R^2 = 0.45$; $F_{2,18} = 7.4$; $P = 0.005$) in MCI. Despite the fact that these associations were absent in HO subjects, regression coefficients did not significantly differ between groups. Conversely, we found a stronger association between higher HCY and decreased TAC levels in MCI than in HO ($F_{4,37} = 4.5$; $P = 0.005$; $\text{Beta} = -1.1$; $t = -2.3$; $P = 0.026$), this relationship reaching statistical significance only in the former group ($R^2 = 0.31$; $F_{2,18} = 4.0$; $P = 0.037$).

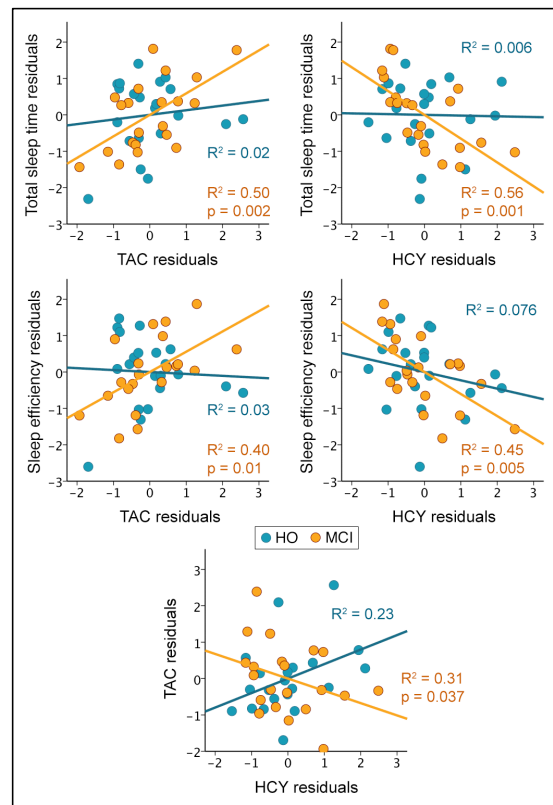


Figure 1. Correlations between TAC, HCY, and sleep. Scatter plots of residuals after linear regression of TAC/HCY against total sleep time/sleep efficiency for HO (in blue) and MCI (in orange). The relationship between HCY and TAC is shown in the bottom panel. The coefficients of determination (R^2) and probability (p value) for each group are also indicated.

Having characterized the close association between HCY, TAC and sleep in MCI, we next sought to determine if sleep acted as a mediator of the relationship HCY-TAC. Joint and indirect effects derived from single mediation models indicated that this occurred in MCI, but not in HO subjects. More specifically, we found that increased levels of HCY resulted in poorer objective sleep (i.e., shortened sleep duration and reduced sleep efficiency), which in turn led to significant reductions of TAC levels in MCI (Figure 2A and 2B, respectively). Conversely, HCY did not mediate the impact of sleep on TAC.

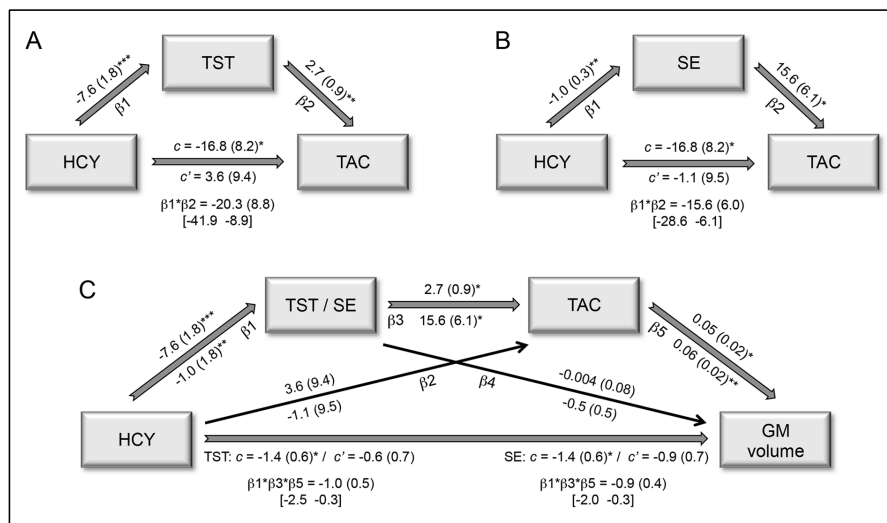


Figure 2. Single and multiple mediation effects. Standardized regression coefficients (standard error) for the relationship between HCY and TAC as mediated by total sleep time (A) or sleep efficiency (B) in MCI. (C) Standardized regression coefficients (standard error) for the relationship between HCY and GM loss as serially mediated by total sleep time/sleep efficiency and TAC in MCI. The standardized regression coefficient (standard error) between HCY and TAC or between HCY and GM before (c) and after controlling for either sleep or sleep and TAC (c') are also indicated. Standardized regression coefficients (standard error) for the two-path ($\beta_1 * \beta_2$) and three-path ($\beta_1 * \beta_3 * \beta_5$) indirect effects together with the 95% bias-corrected bootstrap confidence intervals from 10000 bootstrap samples are indicated in the bottom part of each model. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$.

Serial relationship between HCY, TAC, sleep, and GM

Regression analyses revealed a positive correlation in MCI between TAC and GM in the left middle temporal lobe ($P_{FWE-corrected} = 0.002$; MNI coordinates of the peak voxel: [-60 -57 9]). These results are illustrated in Figure 3A. Interestingly, GM loss in this region was further associated with increased HCY levels in MCI ($P_{FWE-corrected} = 0.014$; [-53 -54 6]). Group comparison of regression coefficients did not achieved statistical significance. The scatter plots for both analyses are shown in Figure 3B and 3C.

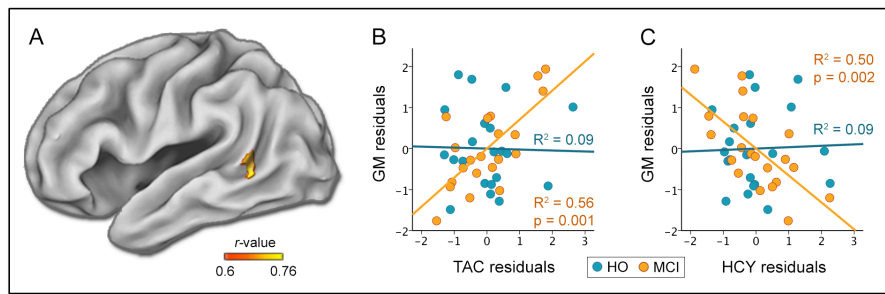


Figure 3. Correlations between HCY/TAC and GM. (A) Significant results derived from a linear regression between TAC and GM ($p < 0.05$; FWE corrected) in MCI. Scatter plots of residuals after regression of TAC (B) or HCY (C) against GM for HO (in blue) and MCI (in orange). The coefficients of determination (R^2) and probability (p value) for each group are also indicated.

Given that GM loss in the same brain region (i.e., left middle temporal lobe) was significantly correlated with both increased HCY and decreased TAC levels, we tested the serial multiple-mediation effect illustrated in Figure 2C. Results derived from this model showed that joint effects and the three-path indirect effect reached statistical significance for both total sleep time and sleep efficiency, but only in MCI (Figure 2C). Reversing the direction of the mediation (HCY \rightarrow TAC \rightarrow sleep \rightarrow GM loss) and of the dependent and independent variables (GM loss \rightarrow sleep \rightarrow TAC \rightarrow HCY) yielded non-significant results.

DISCUSSION

The present study provides the first evidence that poor sleep quality in MCI, in addition to being independently associated with reduced TAC and increased HCY, mediated the relationship between HCY and TAC, two factors prominently involved in the pathological cascade of AD^{4,10}. Furthermore, we found that HCY-related GM loss in MCI was determined by the serial relationship between sleep and TAC, revealing a complex association between risk factors and sleep from prodromal AD stages. While still correlative in nature, these findings lends credence to the hypothesis that HCY activates a damaging reciprocal process that disturbs methylation and/or redox homeostasis by enhancing A β neurotoxicity²³, and that sleep loss plays a key role in exacerbating this pernicious cycle in MCI. Given the modifiable nature of these factors,

our results raise the possibility that tailoring interventions aimed at both lowering HCY levels and improving sleep quality may contribute to slowing cognitive decline and progression of AD.

To the best of our knowledge, this is the first study to pinpoint an association between objective sleep and TAC in prodromal AD. Our results reveal that both shortened sleep duration and reduced sleep efficiency were associated with decreased TAC levels in MCI. We postulate that an increase in soluble A β species and/or deposition of A β aggregates may be the critical factor in determining such an association. This increase creates a vicious cycle wherein poor sleep and A β accumulation are mutually strengthened, subsequently producing oxidative damage that leads to increased A β burden, which in turn contributes to the reinforcement of this positive-feedback loop. This hypothetical model, illustrated in Figure 4, is based on evidence supporting the existence of a bi-directional relationship between sleep and A β deposition²⁴, and between A β aggregation and A β -induced oxidative stress²⁵. Regarding the sleep-A β relationship, previous studies have shown that sleep loss increases CSF A β levels in rodents¹⁴ and in humans with presenilin mutations²⁶. Further, the sleep-wake cycle suffers following plaque formation in transgenic mouse models of amyloidosis (26). In the relationship between A β and oxidative stress, evidence suggests that A β accumulation induces ROS that in turn increases A β production and aggregation, ultimately accelerating the progression of AD²⁷. This model is complemented by studies that demonstrate a bi-directional relationship between sleep loss and increased oxidative stress with age¹².

The relationship between poor sleep quality and reduced TAC levels in MCI could also be due to the presence of sleep-disordered breathing, characterized by recurrent arousals from sleep and intermittent hypoxemia. Sleep-disordered breathing has been associated with advanced cognitive decline in the elderly²⁸ and greater A β burden in MCI²⁹. In the light of these considerations, previous studies have shown that hypoxia causes sleep fragmentation, both conditions related to increased inflammation and aggravation of AD pathology³⁰. Moreover, hypoxia produces oxidative damage to cellular compartments, especially in the vascular endothelium and neuronal cell bodies³¹, and increases cellular apoptosis in hippocampus and cortex³². Future studies should therefore clarify whether sleep-disordered breathing contributes independently or synergistically to the relationship between sleep and TAC in prodromal AD.

Our findings provided the first link between HCY and sleep in MCI. Previous studies have revealed that combined exposure to HCY and copper promotes oxidative damage and enhances A β neurotoxicity in neuronal cultures³³. These findings are complemented by others showing that copper is associated with CSF A β in AD patients³⁴, likely because copper accumulation in brain vessels disrupts A β clearance³⁵. Whether the serial relationship between HCY, copper and A β aggregation is affecting sleep in MCI/AD is a testable hypothesis for future experiments. This hypothesis is illustrated in Figure 4.

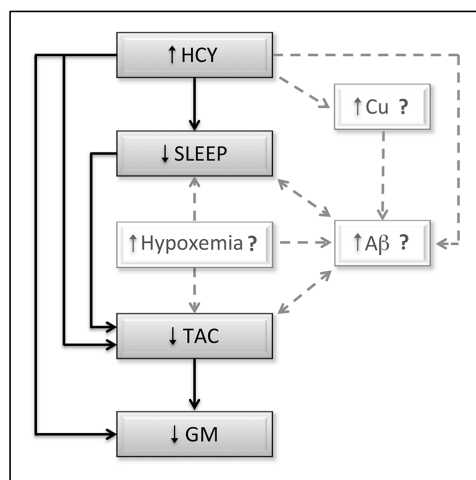


Figure 4. Hypothetical model linking our results with other potentially intervening factors. Gray boxes and black solid arrows are based on findings of the current study; while white boxes and gray dashed arrows refer to other potentially intervening elements derived from alternative evidence. Our findings suggest that the relationship between HCY and TAC was mediated by poor sleep, while the impact of HCY on GM was mediated by the relationship between sleep and TAC. Based on previous evidence, we hypothesize that the impact of HCY on TAC could further be mediated by copper accumulation and/or A β aggregation in the brain, and that sleep disruptions could be additionally prompted by increased hypoxemia, which in turn has also shown to enhance A β burden.

We further demonstrated that decreased TAC and increased HCY levels in MCI were associated with GM loss in regions of the middle temporal lobe. While our findings provide the first evidence of TAC-related GM loss in prodromal AD, HCY-related structural brain changes have been previously reported¹¹. Here we have reached another

milestone by showing that the impact of increased HCY levels on GM loss further depends on the serial relationship between sleep and TAC in MCI. A β burden, resulting from increased HCY and poor sleep, may exacerbate this complex relationship in MCI, accounting for the lack of such a serial mediation effect in HO in the present study.

Our findings offer novel empirical foundations to modify lifestyle risk factors aimed at promoting cognitive health in the elderly. For instance, breaking the link between HCY and TAC by enhancing sleep may be beneficial in slowing cognitive decline in individuals who are at risk of AD. Recent evidence suggests that poor sleep quality was associated with cognitive decline in normal elderly subjects after 3 years of follow-up³⁶. Consequently, the identification of impaired sleep in middle age may offer opportunities to prevent cognitive decline late in life. Furthermore, HCY is a risk factor for brain atrophy and could cause cognitive impairment via direct neurotoxicity or by reinforcing other biological pathways including those of A β ³⁷. Previous studies have shown that treatment with B vitamins in older adults with elevated HCY reduces the rate of brain shrinkage and delays cognitive decline, these interventions being more beneficial in those individuals whose brain shrinkage has not yet reached critical levels³⁸. Therefore, improving B-vitamin status in asymptomatic elderly subjects may play a role in preventing age-related cognitive impairment and decline³⁷. Folic acid supplementation could also be equally advantageous for cognitive function in MCI by lowering peripheral levels of inflammatory cytokines³⁹ and diminishing GM loss in cerebral regions vulnerable to AD⁴⁰.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2011-25463 to J.L.C., PSI2014-55747-R to M.A.); the Regional Ministry of Innovation, Science and Enterprise, Junta de Andalucía (P12-CTS-2327 to J.L.C.); and CIBERNED (CB06/05/1111 to J.L.C.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L.C. and M.A. designed the experiment, analyzed data, prepared figures, and wrote the manuscript. M.P.S.E. collected samples, performed biological determinations, and contributed to the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300 (1956).
2. Schroder, M. & Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789 (2005).
3. Mattson, M.P. & Magnus, T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* **7**, 278-294 (2006).
4. Nunomura, A., *et al.* Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 759-767 (2001).
5. Keller, J.N., *et al.* Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* **64**, 1152-1156 (2005).
6. Torres, L.L., *et al.* Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **26**, 59-68 (2011).
7. Faux, N.G., *et al.* Homocysteine, vitamin B12, and folic acid levels in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy elderly: baseline characteristics in subjects of the Australian Imaging Biomarker Lifestyle study. *J Alzheimers Dis* **27**, 909-922 (2011).
8. Hita-Yañez, E., Atienza, M., Cantero, J.L. Polysomnographic and subjective sleep markers of mild cognitive impairment. *Sleep* **36**, 1327-1334 (2013).
9. Zou, C.G., Banerjee, R. Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* **7**, 547-559 (2005).
10. Li, J.G., Pratico, D. High levels of homocysteine results in cerebral amyloid angiopathy in mice. *J Alzheimers Dis* **43**, 29-35 (2015).
11. Rajagopalan, P., *et al.* Homocysteine effects on brain volumes mapped in 732 elderly individuals. *Neuroreport* **22**, 391-395 (2011).
12. Williams, M.J., *et al.* Recurrent sleep fragmentation induces insulin and neuroprotective mechanisms in middle-aged flies. *Front Aging Neurosci* **8**:180 (2016).
13. Naidoo, N., *et al.* Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *J Neurosci* **28**, 6539-6548 (2008).
14. Kang, J.E., *et al.* Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science* **326**, 1005-1007 (2009).
15. Guidi, I., *et al.* Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**, 262-269 (2006).

16. Sharma, M., Tiwari, M., Tiwari, R.K. Hyperhomocysteinemia: impact on neurodegenerative diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **117**, 287-296 (2015).
17. Zhang, N., *et al.* Daytime sleepiness is associated with hyperhomocysteinemia in rural area of China: A cross-sectional study. *Eur J Intern Med* **35**, 73-77 (2016).
18. Kanagasabai, T. & Arden, C.I. Contribution of inflammation, oxidative stress, and antioxidants to the relationship between sleep duration and cardiometabolic health. *Sleep* **38**, 1905-1912 (2015).
19. Lavie, L., Vishnevsky, A., Lavie, P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* **27**, 123-128 (2004).
20. Sanchez-Espinosa, M.P., Atienza, M., Cantero, J.L. Sleep deficits in mild cognitive impairment are related to increased levels of plasma amyloid- β and cortical thinning. *Neuroimage* **98**, 395-404 (2014).
21. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* **49**, 4619-4626 (2001).
22. Rechtschaffen, A. & Kales, A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system of sleep stages in human subjects. (Los Angeles, Brain Information Service/Brain Research Institute, University of California, 1968).
23. Obeid, R. & Herrmann, W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* **580**, 2994-3005 (2006).
24. Ju, Y.E., Lucey, B.P., Holtzman, D.M. Sleep and Alzheimer disease pathology--a bidirectional relationship. *Nat Rev Neurol* **10**, 115-119 (2014).
25. Guglielmotto, M., *et al.* Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci* **2**, 3 (2010).
26. Roh, J.H., *et al.* Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of β -amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. *Sci Transl Med* **4** (150):150ra122 (2012).
27. Mao, P. & Reddy, P.H. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 1359-1370 (2011).
28. Osorio, R.S., *et al.* Sleep-disordered breathing advances cognitive decline in the elderly. *Neurology* **84**, 1964-1971 (2015).
29. Spira, A.P., *et al.* Objectively measured sleep and β -amyloid burden in older adults: A pilot study. *SAGE Open Med* **2** (2014).

30. Sun, X., *et al.* Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 18727-18732 (2006).
31. Aliev, G. *et al.* Role of vascular hypoperfusion-induced oxidative stress and mitochondria failure in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Neurotox Res* **5**, 491-504 (2003).
32. Gozal, D., Daniel, J.M., Dohanich, G.P. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci* **21**, 2442-2450 (2001).
33. White, A.R., *et al.* Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* **76**, 1509-1520 (2011).
34. Squitti, R., *et al.* Excess of nonceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF [beta]-amyloid, and h-tau. *Neurology* **67**, 76-82 (2006).
35. Singh, I., *et al.* Low levels of copper disrupt brain amyloid- β homeostasis by altering its production and clearance. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 14771-14776 (2013).
36. Johar, H., *et al.* Impaired sleep predicts cognitive decline in old people: Findings from the prospective KORA age study. *Sleep* **39**, 217-226 (2016).
37. Morris, M.S. The role of B vitamins in preventing and treating cognitive impairment and decline. *Adv Nutr* **3**, 801-812 (2012).
38. Douaud, G., *et al.* Preventing Alzheimer's disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 9523-9528 (2013).
39. Ma, F., *et al.* Folic acid supplementation improves cognitive function by reducing the levels of peripheral inflammatory cytokines in elderly Chinese subjects with MCI. *Sci Rep* **6**:37486 (2016).
40. McCully, K.S. Homocysteine, Infections, polyamines, oxidative metabolism, and the pathogenesis of dementia and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis* **54**, 1283-1290 (2016).

