

**DEMENCIA FRONTOTEMPORAL POR
MUTACIONES EN EL GEN DE LA
PROGRANULINA. ASPECTOS CLÍNICOS Y
MOLECULARES**

TESIS DOCTORAL

Fermín Moreno Izco

Donostia-San Sebastián 2016

Memoria presentada para optar al título de Doctor

Departamento de Neurociencias



Tesis doctoral dirigida por:

Dr. José Félix Martí Massó

Dr. Adolfo López de Munáin

A Oier, Irati y Aitor

*“Batiscafo monoplaza,
tu foco en el abismo
de las aguas insondables,
sólo tú las averiguas”*

Traducido de “Batiscafo Katiuskas”, “Antònia Font 2006

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Abreviaturas.....	9
Cómo empezó todo	11
Introducción	15
Síndromes clínicos	15
Neuropatología	19
Correlación síndrome clínico-neuropatología	21
La genética de la demencia frontotemporal	22
Mutaciones en el gen de la progranulina como causa de DFT	26
El fenotipo de la DFT-GRN.....	28
Otros fenotipos asociados a mutaciones en GRN	30
Resumen	32
Hipótesis.....	35
Objetivos.....	39
Estudio 1.....	41
Resumen	43
Material y Métodos	44
Resultados.....	45
Discusión actualizada	53
Estudio 2.....	55
Resumen	57
Material y Métodos	57
Resultados.....	58
Discusión actualizada	61
Estudio 3.....	65
Resumen	67
Material y Métodos	67
Resultados.....	69
Discusión actualizada	72
Estudio 4.....	75
Resumen	77
Material y Métodos	77
Resultados.....	80
Discusión actualizada	85

Estudio 5.....	87
Resumen	89
Material y Métodos	90
Resultados.....	93
Discusión actualizada	100
Conclusiones.....	103
Bibliografía	107
Otras publicaciones del autor relacionadas	123
Descripción inicial de la mutación c.709-1G>A en <i>GRN</i> y publicaciones relacionadas con mecanismos moleculares de neurodegeneración	123
Relacionadas con la variante p.A152T en el gen <i>MAPT</i>	123
Relacionadas con la demencia frontotemporal	124
Anexos	125

AGRADECIMIENTOS

Viernes, 29 de Enero de 2016.

Cae la noche y se hace el silencio. Estoy cansado. Es la rutina diaria que hace encender el interruptor; el de la pantalla y el de mi propio pensamiento. Lo he hecho cada noche desde hace ya bastante tiempo: días que se agotaban entre genes, proteínas...

Esta vez es algo diferente. Una leve tensión para no olvidar a ninguna de las personas que me han ayudado en mi formación y que han hecho que viva este trabajo con pasión.

Gracias al doctor José Félix Martí Massó por ser maestro con mayúsculas. A los doctores Nieves Carrera, Miguel Urtasun y Adolfo López de Munáin que forjaron las bases de mi conocimiento de neurología clínica. Este último cultivó además mi interés por la interacción entre nuestro cerebro y nuestros genes.

Gracias a mis compañeros de residencia: Javier Ruiz, Maite Martínez, Maite Mendioroz, Itxaso Martí. Los que estaban antes y los que vinieron después, ya que hemos disfrutado en común en esta familia neurológica.

Mi estancia en el Hospital de Zumarraga me enseñó muchas cosas, gracias a Angel Martínez, Marta Ruibal y tantos otros que me acompañaron en ese viaje al corazón de Gipuzkoa.

Tras ejercer como neurólogo rural trashumante como diría Ramón Zabalza (gracias también por tus relojes) volví a casa, a Donostia. Y aquí, con constancia y tesón hemos logrado poner todos nuestros esfuerzos en este apasionante mundo de las enfermedades neurodegenerativas. Gracias a Begoña Indakoetxea, por ser nuestra cabeza pensante, nuestra referencia, por no dejarte llevar a lugares comunes de pensamiento único. A Myriam Barandiaran, gracias por tu sonrisa, tu disposición, tu conocimiento, gracias por no decir nunca no. Me alegra ver que vienen detrás personas increíbles, que nos empujan, y son nuestra alegría: Alazne Gabilondo, Mikel Tainta, pero también todos los residentes que vinieron detrás de mí, nueva savia, con insaciable curiosidad, a los que tanto debo. Y a todos mis compañeros, todos ellos con

una capacidad de trabajo y unos conocimientos extraordinarios que hacen del servicio de Neurología un ejemplo y un entorno modélico para trabajar.

A nuestros compañeros del Instituto Bionostia, gracias por vuestra disposición y ayuda en estos años: Ainhoa Alzualde, Ana Gorostidi, Miren Zulaica y tantos otros. Gracias a Leyre Curto y Karmele Arnaiz por su ayuda en todas las gestiones burocráticas, para las que soy tan torpe. A las enfermeras y auxiliares que me han ayudado estos años como compañeras de consulta: Maite, Begoña, Idoia, Koro, Gema, y tantas otras, gracias por entender mis rarezas.

Otras personas han sido importantes en mi viaje. En el año 2012 visité la Universidad de California en San Francisco, y allí tuve la oportunidad de trabajar con otro maestro, el profesor Bruce Miller, que me acogió con entusiasmo, calidez y me transmitió importantes conocimientos cimentados en el trabajo de su gran equipo, gracias también a las doctoras Suzee Lee y Lea Grinberg con las que fue un placer trabajar en proyectos comunes.

Un especial agradecimiento a Pascual, siempre has sido un modelo, tu entusiasmo es contagioso y estoy orgulloso de ser tu amigo.

Gracias a mis padres, que me indicaron el camino, me inculcaron los valores en los que ahora me sustento; a mis hermanas Isabel y Lucía, a mis amigos que me han acompañado en las subidas más empinadas. Gracias a todos los que habéis hecho que llegue en este momento: esta noche silenciosa en la que escribo para daros las gracias, a los que me habéis hecho ver que no es la cima lo importante, sino el camino recorrido. Y me siento afortunado de haberlo compartido con todos vosotros.

Y a mis hijos, claro, que lo son todo.

ABREVIATURAS

Aunque hemos hecho un esfuerzo por traducir al español la mayoría de los términos y abreviaturas utilizados, en algunos casos hemos preferido mantener la abreviatura procedente de los términos en inglés debido a que su utilización está ampliamente extendida y pensamos que su traducción en lugar de facilitar la comprensión generaría una mayor confusión. Por convención los nombres de los genes aparecen a lo largo del texto en mayúsculas y cursiva.

APNF: afasia progresiva no fluente

APOE: gen de la apolipoproteína E

ARN: ácido ribonucleico

CTh: grosor cortical (*cortical thickness*)

DFT: demencia frontotemporal

DFTvc: demencia frontotemporal, variante conductual

DLFT: degeneración lobar frontotemporal

DLFT-tau: degeneración lobar frontotemporal con inclusiones tau-positivas

DLFT-TDP: degeneración lobar frontotemporal con inclusiones TDP-43-positivas

DLFT-U: degeneración lobar frontotemporal con inclusiones tau-negativas y ubiquitin-positivas

DS: demencia semántica

DTI: imagen con tensor de difusión (*diffusion tensor imaging*)

EA: enfermedad de Alzheimer

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

EMN: enfermedad de motoneurona

FDG-PET: tomografía de emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa

FUS: proteína *fused in sarcoma*

GRN: gen de la progranulina

PET: tomografía por emisión de positrones

PSP: parálisis supranuclear progresiva

PGRN: proteína progranulina

MAPT: gen de la proteína tau asociada a microtúbulos

pRb: proteína del retinoblastoma

PRNP: gen de la proteína priónica

RM: resonancia magnética

SCB: síndrome corticobasal

SPECT: tomografía por emisión de fotón único

TARDBP: gen de la *TAR DNA-binding protein 43*

TC: tomografía computarizada

TDP-43: proteína *TAR DNA-binding protein 43*

TMEM106B: proteína transmembrana 106B

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

VCP: gen de la *valosin-containing protein*

CÓMO EMPEZÓ TODO

En el año 2006 se publicaron en la revista *Nature* las descripciones iniciales de casos de demencia frontotemporal causados por mutaciones en el gen de la progranulina (*GRN*)^{1,2}. El doctor Adolfo López de Munáin, siempre actualizado en el campo de la genética, conoció de primera mano dichos hallazgos en la *International Conference of Alzheimer Disease and Related Disorders*, celebrada en Madrid en Julio de 2006. Ante la sospecha de que dicha alteración genética pudiera ser la responsable de la enfermedad, en algunas formas familiares de demencia que había atendido personalmente, activó a todos los neurólogos de su entorno; el objetivo era buscar formas familiares de enfermedades neurodegenerativas que pudieran corresponder con el fenotipo clínico descrito en dichos artículos. Quiso el azar, o esta complicada orografía, o esta idiosincrasia del pueblo vasco, que las familias con una mutación genética única en el gen de la *GRN*, a la que hoy ya todos llamamos “la mutación vasca”, fueran apareciendo, constituyendo en el momento actual una de las agrupaciones geográficas de casos más importante en el mundo, sobre todo teniendo en cuenta el reducido espacio geográfico del que proceden. Se trata de más de 15 familias, todas ellas de origen vasco, y procedentes de tres pequeños entornos de la provincia de Gipuzkoa: las comarcas de Bidasoa, Urola Kosta y Tolosaldea.

En los años siguientes se ha avanzado mucho en el conocimiento de esta entidad, su fenotipo clínico, los hallazgos neuropatológicos, algunos factores modificadores de la enfermedad y los mecanismos moleculares implicados. Nuestro grupo ha contribuido modestamente a dicho conocimiento y parte de este trabajo se refleja en esta tesis. Sin embargo, todavía queda un gran trabajo por hacer, pues persisten incertidumbres, que la ardua investigación realizada a nivel internacional en estos años no han logrado resolver. Y entre ellas, la tarea más importante, la búsqueda de un tratamiento eficaz para la enfermedad.

Durante todos estos años los profesionales implicados en el estudio de estas enfermedades en Gipuzkoa hemos seguido estudiando a estos enfermos y a sus familiares, los hemos cuidado, hemos compartido sus miedos, sus frustraciones, su sufrimiento; y hemos conocido sus ilusiones y sus esperanzas. La aportación más importante y a la vez más reconfortante después de estos años acompañando a estas familias es la de poder decir que esos miedos y esas esperanzas son también las nuestras.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La demencia frontotemporal (DFT) comprende un grupo de enfermedades neurodegenerativas clínica y neuropatológicamente heterogéneo que se agrupan por la afectación predominante de los lóbulos frontal y temporal del cerebro, con síntomas de alteración progresiva de la conducta, la personalidad y el lenguaje, con relativa preservación de la memoria³. Tiene una prevalencia estimada de 15-22 por 100.000 habitantes entre los 45 y 64 años, similar a la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en ese grupo de edad⁴. Entre un 30-50% de pacientes con DFT presentan una historia familiar, indicando un componente genético importante y siguiendo, en muchos casos, un patrón de herencia autosómico dominante⁵.

SÍNDROMES CLÍNICOS

Desde el punto de vista clínico existen tres síndromes clínicos clásicos, uno de ellos que afecta predominantemente a la conducta y denominado *demencia frontotemporal variante conductual* (DFTvc) y otros dos síndromes que afectan predominantemente al lenguaje: *la variante no fluente / agramatical de la afasia progresiva primaria o afasia progresiva no fluente (APNF)* y *la variante semántica de la afasia progresiva primaria o demencia semántica (DS)*. Además, a estos síndromes clínicos principales se pueden asociar trastornos motores, como parkinsonismo o enfermedad de motoneurona (EMN), y otros síndromes clínicos también considerados clásicamente como “parkinsonismos atípicos”, como la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y el síndrome corticobasal (SCB)⁵. En muchos casos, los diagnósticos clínicos no son estáticos, y a los síndromes iniciales se añaden síntomas que pueden configurar un síndrome secundario o terciario, dentro del espectro de las DFT⁶.

Clínicamente la DFTvc se caracteriza por una alteración en la personalidad y la conducta interpersonal. Generalmente, los pacientes pueden mostrar apatía, disminución de la motivación, desinhibición con conducta impulsivas o socialmente embarazosas, conductas repetitivas o estereotipadas, falta de empatía, rigidez mental y cambios en la conducta alimentaria, en ocasiones con aumento de preferencia por dulces⁷. Los últimos criterios clínicos propuestos por *The International Behavioural Variant FTD Criteria Consortium (FTDC)* (Tabla 1) han aumentado la sensibilidad diagnóstica respecto a los criterios diagnósticos previos hasta un 86%⁸. En las pruebas

de neuroimagen se suele observar una atrofia, cuya localización puede ser variable, pero afectando preferentemente a lóbulos frontales, estructuras límbicas y lóbulos temporales⁹.

Tabla 1. Criterios internacionales de consenso para la variante conductual de la demencia frontotemporal (Rascovsky et al., 2011)⁸

I. Enfermedad neurodegenerativa

Debe estar presente el siguiente síntoma:

- A. Muestra deterioro progresivo de conducta y/o cognitivo por observación o historia (obtenida de un informador fiable).

II. DFTvc posible

Deben estar presentes al menos tres de los siguientes síntomas conductuales / cognitivos (A-F). Se requiere que los síntomas sean persistentes o recurrentes y no eventos únicos o infrecuentes.

- A. Desinhibición conductual precoz* [uno de los síntomas siguientes (A.1-A.3) debe estar presente]:

- A.1. Comportamiento socialmente inapropiado
- A.2. Pérdida de modales o decoro
- A.3. Acciones impulsivas, temerarias o descuidadas

- B. Apatía o inercia precoz* [uno de los síntomas siguientes (B.1-B.2) debe estar presente]:

- B.1. Apatía
- B.2. Inercia

- C. Pérdida precoz* de la compasión o empatía [uno de los síntomas siguientes (C.1-C.2) debe estar presente]:

- C.1. Respuesta disminuida a las necesidades y sentimientos de otras personas
- C.2. Disminución del interés social o amabilidad

- D. Conductas perseverativas, estereotipadas o conductas compulsivas / ritualistas precoces* [uno de los síntomas siguientes (D.1-D.3) debe estar presente]:

- D.1. Movimientos repetitivos simples
- D.2. Conductas complejas, compulsivas o ritualistas
- D.3. Habla estereotipada

- E. Hiperoralidad y cambios dietéticos [uno de los síntomas siguientes (E.1-E.3) debe estar presente]:

- E.1. Cambio en preferencias dietéticas
- E.2. Atracciones de comida, aumento consumo de alcohol o cigarrillos
- E.3. Conducta de exploración oral o ingesta de objetos no comestibles

- F. Perfil neuropsicológico: déficits ejecutivos / de generación con relativa preservación de memoria y funciones visuoespaciales [todos los síntomas siguientes (F.1-F.3) deben estar presentes]:

- F.1. Déficits en tareas ejecutivas
- F.2. Preservación relativa de memoria episódica
- F.3. Preservación relativa de habilidades visuoespaciales

III. DFTvc probable

Todos los siguientes síntomas (A-C) deben estar presentes.

- A. Cumple criterios para DFTvc posible
 - B. Presenta declive funcional significativo (por información de cuidador o evidenciado por puntuaciones en la *Clinical Dementia Rating Scale* o *Functional Activities Questionnaire*)
-

C. Resultados de imagen consistentes con DFTvc [uno de los siguientes (C.1-C.2) debe estar presente]:

C.1. Atrofia frontal y / o temporal anterior en RM o TC

C.2. Hipoperfusión o hipometabolismo frontal y / o temporal anterior en SPECT o PET

IV. DFTvc con patología definitiva de DLFT

El criterio A y o bien el criterio B o C deben estar presentes.

A. Cumple criterios de DFTvc posible o probable

B. Evidencia histopatológica de DLFT en biopsia o en autopsia

C. Presencia de una mutación patógena conocida

V. Criterios de exclusión de DFTvc

Los criterios A y B deben ser respondidos negativamente para cualquier diagnóstico de DFTvc. El criterio C puede ser positivo para DFTvc posible, pero debe ser negativo para DFTvc probable.

A. El patrón de déficits es explicado de forma más adecuada por otras enfermedades médicas o no degenerativas del sistema nervioso

B. La alteración conductual es explicada de forma más adecuada por un diagnóstico psiquiátrico

C. Biomarcadores fuertemente indicativos de enfermedad de Alzheimer u otros procesos neurodegenerativos

*Como guía general “precoz” se refiere a la presentación de los síntomas dentro de los tres primeros años. DFTvc: demencia frontotemporal variante conductual. DLFT: degeneración lobar frontotemporal. PET: tomografía por emisión de positrones. RM: resonancia magnética. SPECT: tomografía por emisión de fotón único. TC: tomografía computarizada.

La variante no fluente/agramatical de la afasia progresiva primaria o afasia progresiva no fluente (APNF) se caracteriza por un trastorno del lenguaje progresivo con agramatismo, que produce un lenguaje espontáneo con frases cortas, simples y omisiones de preposiciones, adverbios y conjunciones; y por un habla con esfuerzo en la articulación muchas veces asociado a un déficit en la programación de la articulación que constituye una apraxia del habla. Los pacientes presentan, con frecuencia, un lenguaje trabajoso con tartamudeo, bloqueos y errores fonológicos. La prosodia suele estar alterada y hay una fluidez verbal reducida. El almacén semántico, la memoria episódica y la comprensión de palabras y frases simples están conservados. Los criterios diagnósticos establecidos por consenso en 2011 se recogen en la Tabla 2¹⁰. Muchos pacientes con un diagnóstico inicial de APNF desarrollan posteriormente un síndrome motor compatible con el diagnóstico de síndrome corticobasal o parálisis supranuclear progresiva¹¹. En las pruebas de neuroimagen la atrofia se suele localizar en la región frontal inferior del hemisferio izquierdo, implicando de forma habitual al opérculo frontal e ínsula anterior¹².

Tabla 2. Características diagnósticas de la variante no fluente / agramatical de la afasia primaria progresiva (Gorno-Tempini et al., 2011)¹⁰

I. Diagnóstico clínico de la variante no fluente / agramatical de la APP

Debe estar presente al menos uno de los siguientes características centrales:

1. Agramatismo en la producción del lenguaje
2. Habla con esfuerzo, titubeante con errores fonológicos inconsistentes y distorsiones (apraxia del habla)

Debe estar presente al menos dos de las tres siguientes características:

1. Comprensión alterada de frases sintácticamente complejas
2. Preservación de la comprensión de palabra única
3. Conocimiento de objetos preservado

II. Diagnóstico con apoyo de imagen de la variante no fluente / agramatical de la APP

Deben estar presentes los dos siguientes criterios:

1. Diagnóstico clínico de la variante no fluente / agramatical de la APP
2. La imagen debe mostrar uno o más de los siguientes resultados
 - a. Atrofia predominante frontal posterior-insular izquierda en RM o
 - b. Hipoperfusión o hipometabolismo en SPECT o PET de predominio frontal posterior-insular izquierdo

III. Diagnóstico con patología definitiva de la variante no fluente / agramatical de la APP

Deben estar presentes el diagnóstico clínico (criterio 1 de abajo) y o bien el criterio 2 o el criterio 3:

1. Diagnóstico clínico de la variante no fluente / agramatical de la APP
2. Evidencia histopatológica de una patología neurodegenerativa específica (p.ej. DLFT-tau, DLFT-TDP, enfermedad de Alzheimer, otra)
3. Presencia de una mutación patógena conocida

APP: afasia primaria progresiva. DLFT-tau: degeneración lobar frontotemporal con inclusiones tau positivas. DLFT-TDP: degeneración lobar frontotemporal con inclusiones TDP-43 positivas. PET: tomografía por emisión de positrones. RM: resonancia magnética. SPECT: tomografía por emisión de fotón único.

La variante semántica de la afasia progresiva primaria o demencia semántica (DS) se caracteriza por una alteración de la memoria semántica, con anomia y déficits en la comprensión de palabras, pero con relativa preservación de los aspectos fonológicos y sintácticos del lenguaje, de la memoria episódica y de las habilidades visuoespaciales. Inicialmente se objetiva una dificultad para la comprensión de palabras, pero cuando progresa la alteración semántica aparecen también dificultades en el reconocimiento de personas y objetos, incluso cuando se presentan a través de otras modalidades sensoriales (visual, táctil, etc.). Los criterios diagnósticos se recogen en la Tabla 3¹⁰. Anatómicamente se ha asociado con atrofia en la zona anterior de ambos lóbulos temporales con predominio izquierdo¹³.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de la variante semántica de la afasia primaria progresiva (APP) (Gorno-Tempini et al., 2011)¹⁰

<p>I. Diagnóstico clínico de la variante semántica de la APP</p> <p>Deben estar presentes ambas características centrales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Alteración en la denominación por confrontación 2. Alteración de la comprensión de palabra única <p>Debe estar presente al menos tres de las siguientes características:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Alteración en el conocimiento de objetos, especialmente para objetos de baja frecuencia o familiaridad 2. Dislexia de superficie o digrafía 3. Repetición preservada 4. Producción del habla preservada (lenguaje gramático y motor) <p>II. Diagnóstico con apoyo de imagen de la variante semántica de la APP</p> <p>Deben estar presentes los dos siguientes criterios:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico clínico de la variante semántica de la APP 2. La imagen debe mostrar uno o más de los siguientes resultados <ol style="list-style-type: none"> a. Atrofia predominante temporal anterior o b. Hipoperfusión o hipometabolismo en SPECT o PET de predominio temporal anterior <p>III. Variante semántica de la APP con patología definitiva</p> <p>Deben estar presentes el diagnóstico clínico (criterio 1 de abajo) y o bien el criterio 2 o el criterio 3:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico clínico de la variante semántica de la APP 2. Evidencia histopatológica de una patología neurodegenerativa específica (p.ej. DLFT-tau, DLFT-TDP, enfermedad de Alzheimer, otra) 3. Presencia de una mutación patógena conocida
--

APP: afasia primaria progresiva. DLFT-tau: degeneración lobar frontotemporal con inclusiones tau positivas. DLFT-TDP: degeneración lobar frontotemporal con inclusiones TDP-43 positivas. PET: tomografía por emisión de positrones. SPECT: tomografía por emisión de fotón único.

NEUROPATOLOGÍA

Neuropatológicamente el término para referirnos a estas enfermedades es el de degeneración lobar frontotemporal (DLFT) y se clasifican en función de las características histopatológicas y el tipo de inclusiones patológicas. La clasificación de consenso se recoge en la Tabla 4^{14,15}. Aproximadamente el 50% de las DLFT presentan inclusiones patológicas cuyo principal constituyente es la proteína *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43) y se denominan DLFT-TDP. En función de las características y distribución de las inclusiones patológicas de TDP-43 se clasifican en varios subtipos (A-D)¹⁶. En un 40% de los casos es la proteína tau la principal componente de las inclusiones patológicas (DLFT-tau). Dentro de estas tauopatías existen varias entidades en función de la distribución y morfología de las inclusiones. Además, la proteína tau está presente en el sistema nervioso en diferentes isoformas, en función del *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10, generándose formas con

tres (3R) o cuatro (4R) dominios de unión a microtúbulos. En función de la presencia predominante de las isoformas de tau en las inclusiones, las DLFT-tau se clasifican también en tauopatías 3R, de las cuales la más frecuente es la enfermedad de Pick, o tauopatías 4R, entre las que se encuentran la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal o la demencia con granos argirófilos¹⁷. En el año 2009 se constató que la mayoría de los casos de DLFT con inclusiones ubiquitinadas, pero negativas para tau y TDP-43, presentaban inmunorreactividad para la proteína *fused in sarcoma* (FUS), por lo que pasaron a denominarse DLFT-FUS. Constituyen aproximadamente un 10% de los casos de DLFT¹⁸. Existe aún un pequeño porcentaje de pacientes con DLFT-U en los que las proteínas ubiquitinadas no han sido todavía identificadas, y a este grupo se le denomina DLFT-UPS (*ubiquitin proteasome system*).

Tabla 4. Nomenclatura actualizada de los subtipos neuropatológicos de la degeneración lobar frontotemporal (adaptado de Mackenzie IR, et al., 2010)¹⁵

Tipo molecular	Subtipos reconocidos	Genes asociados
DLFT-tau	Enfermedad de Pick	<i>MAPT</i>
	Degeneración corticobasal	
	Parálisis supranuclear progresiva	
	Enfermedad de granos argirófilos	
	Tauopatía sistémica múltiple con demencia (actualmente dentro de tauopatías globulares gliales)	
	Demencia con predominio de ovillos neurofibrilares (actualmente dentro de astrogliopatía tau asociada a la edad)	
	Inclasificable	
DLFT-TDP		<i>GRN</i>
	Tipos A-D	<i>VCP</i>
		<i>C9ORF72</i>
	Inclasificable	<i>(TARDBP)</i>
DLFT-UPS	Demencia frontotemporal ligada al cromosoma 3	<i>CHMP2B</i>
DLFT-FUS	DLFT atípica con inclusiones ubiquitinadas	<i>(FUS)</i>
	Enfermedad con inclusiones de filamentos neuronales intermedios	
	Enfermedad con cuerpos de inclusión basófilos	
DLFT-ni		

DLFT-ni: DLFT sin inclusiones.

CORRELACIÓN SÍNDROME CLÍNICO-NEUROPATOLOGÍA

Una de las mayores dificultades diagnósticas a las que se enfrenta el clínico ante estas enfermedades es que el síndrome clínico no predice de forma adecuada el tipo de “proteíno patía”. Las enfermedades neurodegenerativas afectan a redes neuronales específicas produciendo síndromes clínicos y patrones de atrofia característicos; pero cada síndrome puede resultar de patologías moleculares subyacentes diferentes (β -amiloide, tau, alfa-sinucleína, TDP-43, etc.)¹⁹. En algunos casos, el síndrome clínico sí que puede orientar hacia el tipo de proteíno patía subyacente, por ejemplo cuando se asocia enfermedad de motoneurona, o cuando el síndrome clínico es el de la demencia semántica, la patología subyacente es en la mayoría de los casos FTLD-TDP. Por el contrario, cuando estamos ante un síndrome clínico de parálisis supranuclear progresiva o afasia progresiva no fluente, es más probable que se trate de una DLFT-tau. Sin embargo, en muchos casos, y de forma paradigmática en el de la DFTvc, no se puede predecir de forma fiable la proteíno patía subyacente. Además, en estas enfermedades se solapa un tercer plano a esta correspondencia clínico-patológica, que es la genética. Aproximadamente un 40% de los pacientes con DFTvc tienen antecedentes familiares, siendo este porcentaje mucho menor en los síndromes clínicos de APNF y DS. En un 10% de casos con DFT la historia familiar es consistente con una herencia autosómica dominante^{20,21}. Las mutaciones conocidas más frecuentes son las de los genes de la proteína tau asociada a microtúbulos (*MAPT*), progranulina (*GRN*) y *C9ORF72*⁴. Pueden existir características fenotípicas, además de los antecedentes familiares, que ayuden al clínico a sospechar la existencia de una mutación causal en uno de los genes relacionados con la DFT que se exponen a continuación. Esta correspondencia clínico-genética-patológica se esquematiza en la Figura 1¹⁷.

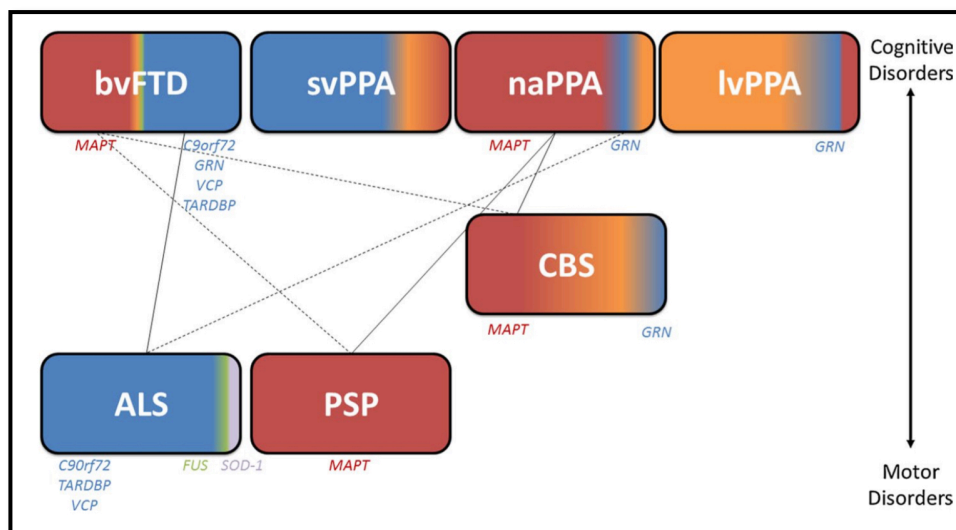


Figura 1. Figura esquemática tomada de Irwin et al., *Acta Neuropathol*, 2014¹⁷ Asociaciones clínico-patológicas y genéticas en DFT. El esquema representa las frecuencias relativas de los subtipos neuropatológicos y las mutaciones asociadas. Las asociaciones comunes entre síndromes se representan con líneas continuas, mientras que las líneas discontinuas representan asociaciones menos comunes. La patología DLFT-tau (**rojo**) se encuentra virtualmente en todos los casos de PSP y en la mayoría de las APNF. También se encuentra esta patología en un porcentaje de casos de SCB y DFTvc. La patología TDP-43 (**azul**) se encuentra en casi todas las ELAs y en la mayoría de las DS, mientras que aproximadamente la mitad de los casos de DFTvc tienen patología de DLFT-TDP. Las presentaciones atípicas de la enfermedad de Alzheimer (**naranja**) se observan en casos de SCB y menos probablemente en la DS y la APNF. Finalmente, una pequeña proporción de casos de ELA tiene patología FUS (**verde**) o SOD-1 (**gris**). FUS también es un infrecuente sustrato patológico de la DFTvc. Las etiologías genéticas ligadas a los fenotipos clínicos están representadas debajo en orden de frecuencia.

LA GENÉTICA DE LA DEMENCIA FRONTOTEMPORAL

En los últimos años hemos asistido a una auténtica revolución en el conocimiento de las bases genéticas de la demencia frontotemporal. Por una parte, se han ido describiendo diversos genes causantes de formas familiares, habitualmente con herencia autosómica dominante y elevada penetrancia. En 1998 se describieron mutaciones en el gen *MAPT*, localizado en el cromosoma 17, en familias con DFT y parkinsonismo^{22,23}. Se conocía también la existencia de familias con DFT autosómica dominante asociadas al cromosoma 17 en estudios de ligamiento, pero que no presentaban mutaciones en *MAPT*, y en la autopsia presentaban una patología con inclusiones ubiquitin-positivas, pero tau-negativas. Es en 2006 cuando se describen mutaciones en el gen de la progranulina (*GRN*), también en el cromosoma 17, como causantes de estas formas de DLFT-U (posteriormente DLFT-TDP), siendo así el segundo gen relacionado con DLFT en el cromosoma 17^{1,2}. Posteriormente, en el año 2011 se describe una expansión patológica de un hexanucleótido GGCCCC en el primer intrón del gen *C9ORF72*, en el cromosoma 9, en familias con fenotipos mixtos de demencia frontotemporal y esclerosis lateral amiotrófica (ELA)^{24,25}, lo que establece

un vínculo genético definitivo entre estas dos entidades. Las mutaciones en estos tres genes (*C9ORF72*, *GRN* y *MAPT*) constituyen un porcentaje elevado de las formas familiares de DLFT, con una frecuencia relativa variable según el contexto geodemográfico. En los últimos años también se han descrito mutaciones en otros genes que, con mucha menor incidencia, también pueden producir formas familiares de DLFT asociados o no con enfermedad de motoneurona: *valosin-containing protein (VCP)*²⁶, *43-kDa transactive response (TAR)-DNA-binding protein (TARDBP)*^{27,28,29}, *fused in sarcome (FUS)*³⁰, *charged multivesicular body protein 2B gene (CHMP2B)*³¹, *sequestosome 1 gene (SQSTM1)*^{32,33}, *ubiquilin-2 (UBQLN2)*^{34,35}, *coiled-coil helix coiled-coil helix domain containing protein 10 (CHCHD10)*³⁶ (Tabla 5)⁴.

Además de las alteraciones genéticas que producen formas “mendelianas” de la enfermedad, en los últimos años, el desarrollo de técnicas de secuenciación genética cada vez más potentes, y la realización de estudios colaborativos a gran escala, han permitido describir otros genes cuyas alteraciones no causan formas familiares de la enfermedad, pero constituyen factores genéticos de riesgo. Por una parte, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS como se conocen por su acrónimo inglés: *genome-wide association studies*) permiten detectar variantes genéticas comunes en la población asociadas con un riesgo genético bajo. En el caso de la demencia frontotemporal, dos son los estudios más importantes realizados; en primer lugar, en un estudio colaborativo internacional para identificar *loci* de susceptibilidad para DLFT-TDP se encontró una asociación con polimorfismos de riesgo en el gen *TMEM106B*³⁷. Este hallazgo se ha visto reforzado al comprobarse posteriormente que las variantes en *TMEM106B* pueden modificar el fenotipo clínico de pacientes con otras mutaciones patogénicas causantes de DFT como *GRN*^{38,39} o *C9ORF72*^{40,41}. En segundo lugar, en un estudio que analizaba muestras de 3526 pacientes con DFT y 9402 controles sanos de origen europeo se observó una asociación para toda la cohorte de DFT con locus del HLA, implicado en la inmunidad, y para el subgrupo de pacientes con DFTvc, con un locus que contiene los genes *RAB38* y *cathepsin C (CTSC)*, implicados en la biología lisosomal⁴².

Por otra parte, los avances en las técnicas de secuenciación y análisis han permitido en los últimos años la secuenciación de un amplio número de genes, o incluso todo el genoma, en un amplio número de muestras lo que permite estudiar la contribución de variantes genéticas raras al riesgo genético de enfermedades complejas. En el caso de la DFT se han descrito variantes raras en el gen *TREM2*

asociadas con el riesgo de la enfermedad⁴³. En un principio, la variante p.R47H en *TREM2* se había asociado con un mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer⁴⁴, pero se ha postulado que este gen, con una implicación en la fagocitosis efectiva de neuronas apoptóticas por la microglía, pudiera tener un papel más generalizado en diversas formas de neurodegeneración⁴⁵. Por último, en el año 2012 se describió que una variante rara, p.A152T, en el gen de la proteína tau asociada a microtúbulos (*MAPT*), estaba asociada con el riesgo tanto de enfermedad de Alzheimer como de demencia frontotemporal⁴⁶. Nuestro grupo contribuyó al conocimiento del fenotipo clínico de pacientes portadores de dicha variante en *MAPT*⁴⁷. Además, encontramos que un elevado porcentaje de los pacientes con DFT en las familias que habíamos descrito en 2008 con una mutación en *GRN* eran al mismo tiempo portadores de esta variante rara p.A152T en *MAPT*. Este hallazgo constituye parte importante del cuerpo de estudio de esta tesis y está recogido en el artículo 5.

Tabla 5. Genes asociados con la demencia frontotemporal (DFT) (adaptado de Ng A. Et al., 2014)⁴

Gen	Sustrato patológico	DFTf (%)	DFTe (%)	DFT-ELA (%)	Edad media de inicio	Presentación clínica	Asociación EMN
C9ORF72	TDP-43 tipo A y B; inclusiones p62	25	6	30	55-58	DFTvc (80%), puede asociar parkinsonismo	Asociada frecuentemente
GRN	TDP-43 tipo A	5-11	5	Raro	58	DFTvc (>50%), APNF, parkinsonismo frecuente	Raro
MAPT	DLFT-tau	2-11	-	Raro	48	DFTvc, parkinsonismo	Raro
VCP	TDP-43 tipo D	<1	-	Raro	42 (miopatía), 57 (DFT)	Miopatía (90%), enfermedad de Paget (50%), DFT (30%)	Raro
TARDBP	TDP-43	Familias aisladas	-		55	ELA, casos aislados DFTvc, síndromes motores	Presentación habitual ELA
FUS	Inclusiones FUS +	Familias aisladas	-		46	ELA, casos aislados de DFT-parkinsonismo	Presentación habitual ELA
CHMP2B	DLFT-UPS	<1	-	Raro	58	DFTvc, síndrome motor más tardío	Raro, 1%
SQSTM1	P62	<2-4.4%	-	<2-2.7%	60	Enfermedad de Paget en >30%, DFTvc en >65%	Sí
UBQLN2	Ubiquilin-2; TDP-43	-	Muy raro	Raro	Muy variable	DFTvc precede síntomas motores	Sí

APNF: afasia progresiva no fluente. DFTe: demencia frontotemporal esporádica. DFT-ELA: demencia frontotemporal con esclerosis lateral amiotrófica. DFTf: demencia frontotemporal familiar. DFTvc: demencia frontotemporal variante conductual. EMN: enfermedad de motoneurona.

MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROGRANULINA COMO CAUSA DE DFT

En el año 2006 se describieron mutaciones en el gen de la progranulina (*GRN*), localizado en el cromosoma 17q21-22, en pacientes con DFT hereditaria con neuropatología consistente en inclusiones tau-negativas y ubiquitin-positivas^{1,2}. El gen *GRN* se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 17, a aproximadamente 1.7 Mb de distancia del gen *MAPT*. Desde entonces se han descrito más de 65 mutaciones patogénicas y algunas deleciones en el gen de la *GRN* (*Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database: www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/*). La frecuencia relativa de mutaciones en *GRN* difiere entre estudios, en parte debido a potentes efectos fundador en muchas poblaciones, sesgos en el estudio de los pacientes, y variaciones geo-demográficas. Se han descrito mutaciones en *GRN* en un 10% de todos los pacientes con DFT y en un 22% de los casos de DFT familiar en una amplia serie de EEUU⁴⁸. Estas mutaciones son predominantemente del tipo *nonsense*, *frameshift* y *splice-site*, cuyo mecanismo patógeno habitual es la alteración del marco de lectura con creación de codones de stop prematuros. Esto da lugar a formación de ARN mensajero mutado, que sufre una degradación no dirigida (*nonsense mediated decay*). Se trata de un mecanismo de supervivencia diseñado para proteger al organismo contra los efectos deletéreos de las proteínas truncadas que se producirían si los ARN mensajeros mutados fueran estables⁴⁸. Por tanto, el mecanismo patógeno de la mayoría de las mutaciones en *GRN* parece que es uniforme, y consiste en la pérdida funcional de la proteína progranulina (PGRN) o haploinsuficiencia^{1,2,48,49}.

La progranulina es una proteína segregada que se expresa en múltiples tejidos y tipos celulares en todo el organismo. La estructura del gen y la proteína progranulina se esquematizan en la figura 2. PGRN tiene acciones pleiotrópicas incluyendo un papel en tumores y en inflamación. La expresión de PGRN está aumentada en diferentes formas de cáncer: carcinomas de mama, ovario, renal y también en sarcomas y gliomas^{50,51}. Además, el aumento de expresión de PGRN confiere un fenotipo agresivo a diferentes tumores⁵⁰. Mientras que la progranulina tiene propiedades de factor de crecimiento y anti-inflamatorias, puede ser escindida por proteasas extracelulares como la elastasa, para formar péptidos denominados granulinas, que son proinflamatorias⁵². La progranulina se puede unir a varios receptores; se une al receptor del factor de necrosis tumoral TNF α (TNFR) actuando como antagonista con función anti-inflamatoria al bloquear la señal pro-inflamatoria inducida por TNF α ⁵³. También PGRN en las neuronas se une a sortilina y facilita su

endocitosis y transporte a los lisosomas, lo que parece regular los niveles extracelulares de PGRN⁵⁴. En el cerebro se expresa en neuronas y microglía fundamentalmente. Se ha observado en diferentes estudios que, en respuesta a diferentes lesiones o patologías, se produce un aumento de la expresión de progranulina por microglía o macrófagos⁵⁵; y aunque sus funciones no son totalmente conocidas, parece que además de su papel en la respuesta inflamatoria es neurotrófica^{56,57}, interviene en la función sináptica⁵⁸ y en la función lisosomal⁵⁹. La deficiencia de la progranulina como causa de DLFT establece un interesante vínculo entre inflamación y neurodegeneración. En un estudio en sujetos de DFT con mutaciones en *GRN* se objetivaron aumento de los niveles plasmáticos del mediador inflamatorio interleukina 6 (IL-6) frente a controles y pacientes con DFT sin mutaciones en *GRN*⁶⁰. La relación entre la disminución de niveles de PGRN y la patología TDP-43 todavía no es bien conocida, aunque hay estudios que han encontrado que la alteración en la localización o escisión de TDP-43 a través de caspasa 3 está mediada por PGRN^{61,62}.

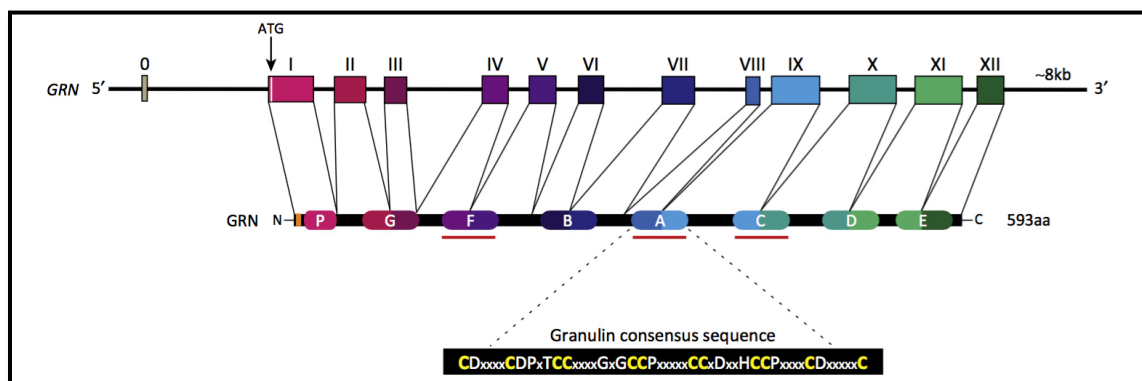


Figura 2. Representación esquemática del gen y la proteína progranulina tomada de Petkau et al., *Trends Neurosci*, 2014⁵⁹. El gen *GRN*, localizado en el cromosoma 17q21.32 consta de 13 exones, doce de los cuales son codificantes. La proteína PGRN tiene un péptido señal (barra naranja) seguido de siete y media repeticiones en tándem de un motivo granulina, separados por espacios cortos que contienen secuencias de reconocimiento para proteasas extracelulares. Los péptidos de granulina individuales (aproximadamente 6 kDa cada uno) están identificados por letras secuenciales según el orden en que fueron descubiertos. El exón 1 codifica la media repetición denominada paragranulina (P), y a partir de ahí las dos mitades de los otros siete péptidos de granulina son codificados en exones consecutivos, de forma que un péptido de granulina siempre está producido por dos exones. Las mutaciones en *GRN* que causan DLFT pueden ocurrir a lo largo de todo el gen.

Nuestro grupo ha contribuido también al conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la neurodegeneración asociada al déficit de PGRN, gracias al estudio sobre linfoblastos obtenidos de portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*. Se ha postulado, basándose en las funciones mitogénicas de PGRN, que su déficit pudiera inducir alteraciones en el ciclo celular y la vulnerabilidad de las neuronas. Mediante el estudio de estos linfoblastos deficientes en PGRN se ha visto un aumento en la actividad y proliferación celular, asociado a una activación de la vía ERK1/2, de la actividad CDK6 y fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) (vía CDK6/pRb), que resulta en un fallo en la regulación del ciclo celular y la regulación G1/S^{63,64,65}. Estos hallazgos abren posibilidades terapéuticas, pues se ha visto que estas alteraciones del ciclo celular pueden ser revertidas mediante PGRN exógena, sustancias que aumentan los niveles de PGRN, o mediante inhibidores de la vía ERK1/2⁶⁶.

Los niveles plasmáticos de progranulina están reducidos significativamente en sujetos portadores de mutaciones patógenas en *GRN* frente a sujetos controles y otros pacientes con DFT^{67,68,69}. Esta disminución de los niveles plasmáticos aparece ya en sujetos presintomáticos. En sujetos portadores de mutaciones patógenas en *GRN* se observan niveles de PGRN plasmáticos reducidos en aproximadamente un 75% respecto de controles, valores más bajos de lo esperado por la pérdida funcional de un alelo, en cuyo caso se esperaría una reducción de un 50%. Los niveles de PGRN plasmática tan reducidos contrastan con una menor reducción, cercana al 50%, en los niveles de ARN mensajero¹. Estos hallazgos probablemente se expliquen por un metabolismo alterado en los portadores de mutaciones en *GRN* en el que el procesamiento de la PGRN en granulinas está incrementado, y estos sujetos presentan un déficit de PGRN total manteniendo niveles normales de granulinas⁶⁸. Los niveles plasmáticos de PGRN constituyen por tanto un biomarcador accesible y no invasivo para el diagnóstico de DFT asociada a mutaciones en *GRN*.

EL FENOTIPO DE LA DFT-GRN

Un de las características que definen la clínica de los pacientes con mutaciones en el gen de la *GRN* es la variabilidad tanto en la edad de inicio como en la presentación clínica. La edad de inicio es variable incluso dentro de una misma familia, con un rango entre los 35 y los 89 años y una edad media aproximada de 60 años⁴⁹. La duración media de la enfermedad es de 6-7 años (rango: 3-22 años)⁷⁰. Existen

algunas series que han sugerido un fenómeno de anticipación generacional en la edad de inicio⁷¹. Desde el punto de vista clínico los pacientes portadores de mutaciones en *GRN* han recibido diagnósticos habitualmente dentro del espectro clínico de las DFT: DFTvc, afasia primaria progresiva, afasia no fluente progresiva, síndrome corticobasal; pero también han recibido diagnósticos clínicos de enfermedad de Alzheimer y demencia con cuerpos de Lewy^{70,72,73,74,75}. Los síntomas iniciales suelen ser un cambio en la personalidad y una disfunción ejecutiva, aunque también hay sujetos que comienzan con problemas de lenguaje o memoria. La presentación clínica más frecuente es la de una DFTvc con apatía como rasgo conductual más marcado⁷⁴. En los casos en los que la alteración del lenguaje es el síntoma prominente se han descrito presentaciones compatibles con el síndrome de afasia progresiva no fluente, y también con disminución en la generación del lenguaje consistente con afasia dinámica^{74,75}. Es frecuente la aparición posterior de parkinsonismo^{70,72,73,74,75}. En ocasiones se trata de un parkinsonismo asimétrico con apraxia que lleva al diagnóstico de síndrome corticobasal^{76,77,78}. Algunos autores han llamado la atención sobre la elevada prevalencia de alucinaciones visuales (25%) frente a sujetos con DFT sin mutaciones en *GRN*⁷⁵. Es infrecuente la asociación con enfermedad de motoneurona⁷⁸. Desde el punto de vista de neuroimagen se caracteriza por un patrón de atrofia asimétrica de predominio frontal y temporal con afectación parietal variable^{74,79,80,81}. No están claros los factores que influyen en esta asimetría y se ha descrito en ocasiones la preferencia por la afectación de un mismo hemisferio en los miembros de una familia⁷¹.

Desde el punto de vista neuropatológico, en cambio, el fenotipo es bastante homogéneo. Se caracteriza por la presencia de afectación importante con espongiosis laminar superficial del neocórtex y estriado, inclusiones neuronales ubiquitin y TDP-43 positivas, y neuritas distróficas en el neocórtex y núcleos subcorticales. De forma característica, se observan inclusiones neuronales intranucleares lentiformes o en “ojo de gato”^{82,83} (Figura 3). Este patrón patológico se encuadra como DLFT-TDP tipo A dentro de la clasificación de la DLFT-TDP¹⁶.

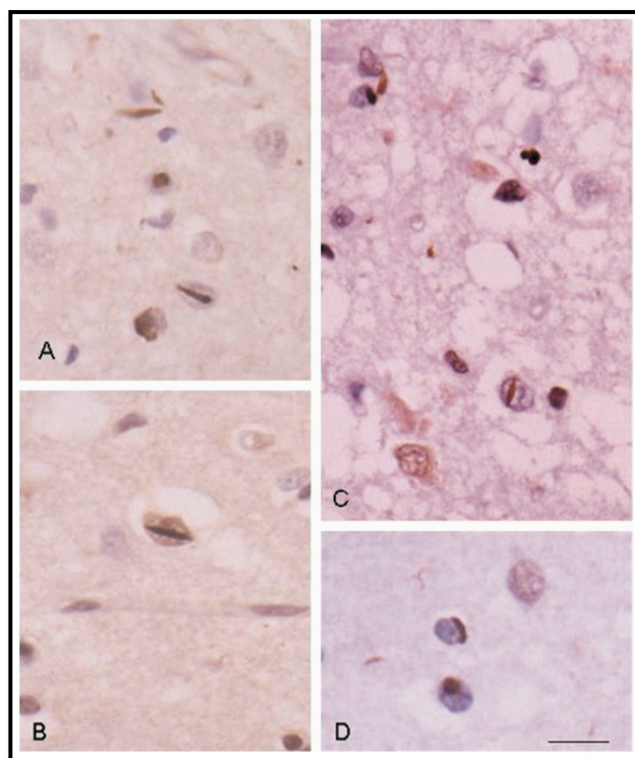


Figura 3. Fotografía patológica tomada de López de Munáin et al., *Biol Psych*, 2008⁸⁴. Se observan neuritas distróficas, inclusiones intracitoplasmáticas e inclusiones intranucleares lentiformes o con forma de “ojos de gato”, que se tiñen con anticuerpos anti-ubiquitina (A,B) y anti-TDP-43 (C,D) en un caso de demencia frontotemporal con mutación en *GRN*. Secciones de parafina levemente teñidas con hematoxilina. Línea = 25 μ m.

OTROS FENOTIPOS ASOCIADOS A MUTACIONES EN *GRN*

Aunque de momento el único fenotipo neuropatológico fehacientemente asociado a mutaciones en *GRN* es el de la DLFT, se ha propuesto que las mutaciones o la variación genética común en *GRN* pueda actuar de forma más heterogénea como factor de riesgo para otras enfermedades neurodegenerativas⁵⁹. Se han descrito mutaciones en *GRN* en casos pertenecientes a cohortes de EA diagnosticados clínicamente, aunque en ausencia de confirmación neuropatológica^{85,86}. En estos casos existe la posibilidad de confusión diagnóstica, máxime teniendo en cuenta que no es infrecuente la presentación de la DFT por mutaciones en *GRN* con afectación predominante de memoria, y con diagnósticos clínicos de EA⁷³. También se han descrito casos aislados de enfermedad de Alzheimer con biomarcadores positivos (indicando depósito de amiloide), o incluso confirmada patológicamente en portadores de mutaciones en *GRN*⁸⁷; y hay estudios que describen cómo polimorfismos en *GRN* pueden modificar el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer^{88,85}. Se especula

que el estado proinflamatorio causado por el déficit de PGRN pueda favorecer no sólo el desarrollo de DLFT, sino también otras formas de neurodegeneración. En este sentido, se ha demostrado en modelos animales que la PGRN inhibe el depósito de beta-amiloide y protege contra su toxicidad⁸⁹.

El *screening* para mutaciones en *GRN* con otros fenotipos neurodegenerativos como ELA^{90,91} o enfermedad de Parkinson⁹² no ha detectado mutaciones patogénicas. Pero otros estudios de asociación genética evaluando la variabilidad genética común en *GRN* han identificado asociaciones entre variantes genéticas en *GRN* y la edad de inicio, la duración de la enfermedad o el riesgo de desarrollar la enfermedad en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)⁹³, la esclerosis múltiple⁹⁴, el trastorno bipolar y la esquizofrenia^{95,96}. Estos hallazgos sugieren que la progranulina interviene de una forma más global en el funcionamiento neuronal normal⁵⁹.

Es interesante señalar, en relación con las mutaciones en el gen de la *GRN*, que inicialmente se había especulado que la pérdida de ambos alelos en *GRN* sería incompatible con la vida por una elevada letalidad embrionaria, hasta que en 2012 se describió una familia con una mutación homocigota en *GRN* causante de un fenotipo clínico de ceroidlipofuscinosis, con niveles prácticamente indetectables de PGRN plasmática (<0.6 ng/ml). La ceroidlipofuscinosis es una enfermedad muy infrecuente, con una clínica, una edad de inicio y una neuropatología muy diferente a la de la DLFT, lo que ilustra el efecto pleiotrópico de una mutación en estado heterocigoto *versus* homocigoto⁹⁷.

RESUMEN

A pesar de la gran cantidad de artículos publicados desde el descubrimiento de las mutaciones en el gen de la progranulina como causa de DLFT en 2006, todavía existen lagunas de conocimiento en cuanto al fenotipo clínico de los pacientes, los factores que influyen en la variabilidad clínica, y los mecanismos moleculares causantes de la neurodegeneración. Esta tesis intenta responder a alguna de estas preguntas mediante el estudio de las familias de origen vasco portadoras de una mutación única en el gen de la *GRN* (c.709-1G>A). El estudio 1 analiza el fenotipo clínico de pacientes con DFT con esta mutación única en *GRN*, el estudio 2 se centra en el estudio de posibles factores genéticos modificadores de la edad de inicio en estos enfermos. Los estudios 3 y 4 describen los hallazgos neuropsicológicos y de neuroimagen en sujetos presintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A. Por último, el estudio 5 analiza la posible influencia en el fenotipo clínico de la rara variante p.A152T del gen *MAPT*, que hemos encontrado asociada a la mutación c.709-1G>A en *GRN* en un alto porcentaje de estos sujetos.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

1. La demencia frontotemporal por mutaciones en el gen *GRN* presenta un fenotipo clínico heterogéneo, con síndromes diferentes dentro del espectro de las demencias frontotemporales.
2. La variabilidad observada en la edad de inicio de la enfermedad en los sujetos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* puede estar determinada por factores genéticos modificadores adicionales.
3. Los sujetos presintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* pueden presentar alteraciones neuropsicológicas y estructurales cerebrales antes del inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad.
4. La coexistencia de la variante p.A152T del gen *MAPT* en sujetos con la mutación c.709-1G>A en *GRN* puede modificar su fenotipo clínico o patológico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterizar el perfil clínico y neuropsicológico de pacientes con la mutación c.709-1G>A en *GRN* centrándonos en los hallazgos neuropsicológicos en la primera evaluación y los patrones de evolución de los síndromes clínicos.
2. Determinar la potencial influencia de factores genéticos seleccionados en la edad de inicio de los pacientes con la mutación c.709-1G>A en *GRN*.
3. Evaluar el rendimiento neuropsicológico de portadores asintomáticos de la mutación c.709-1G>A en *GRN* comparado con sus familiares no portadores de dicha mutación.
4. Estudio de neuroimagen en sujetos portadores asintomáticos de la mutación c.709-1G>A en *GRN*:
 - 4.1. Evaluar los cambios en el grosor cortical en portadores asintomáticos de la mutación en *GRN* y su correlación con la edad.
 - 4.2. Estudiar la relación del grosor cortical con el rendimiento cognitivo en estos portadores asintomáticos de la mutación en *GRN*.
5. Comparar el fenotipo clínico y neuropatológico entre el grupo de pacientes con DFT portadores de la mutación en c.709-1G>A en *GRN* (*GRN*+/*A152T*-) y aquellos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* y la variante p.A152T en *MAPT* (*GRN*+/*A152T*+) y datar la edad de la mutación en estas familias.

ESTUDIO 1

RESUMEN

Demencia “frontotemporoparietal”: Fenotipo clínico asociado con la mutación c.709-1G>A en PGRN

Antecedentes: Las mutaciones en el gen de la progranulina (*GRN*) son una causa importante de degeneración lobar frontotemporal con inclusiones neuronales tau-negativas y ubiquitin-positivas. La mayoría de los estudios previos dirigidos a caracterizar el fenotipo clínico y neuropsicológico de portadores de mutaciones en *GRN* han incluido pacientes con diferentes mutaciones en *GRN*, asumiendo que el mecanismo común propuesto de haploinsuficiencia determina un fenotipo comparable.

Métodos: Estudiamos 21 pacientes con una mutación única tipo *splicing* en *GRN* (c.709-1G>A) en un único centro terciario, utilizando criterios diagnósticos y protocolos homogéneos. Todos los pacientes tenían origen vasco.

Resultados: Los pacientes mostraron un fenotipo variable, tanto en la edad de inicio como en los síntomas de presentación. La demencia frontotemporal variante conductual (52.4%) y la afasia progresiva no fluente (23.8%) fueron los síndromes de presentación más frecuentes. La apatía fue el síntoma conductual más frecuente. Los pacientes desarrollaron una demencia de curso rápidamente progresiva, con hallazgos que llevaron a un diagnóstico secundario en un 61.9% de los casos, dos años después del diagnóstico inicial. De forma llamativa, este diagnóstico secundario o terciario fue de síndrome corticobasal en un 47.6% de los casos, lo que confirmaba los hallazgos neuropsicológicos de disfunción del lóbulo parietal presentes en la evaluación inicial en un 81.8% de los pacientes.

Conclusiones: Los pacientes portadores de la mutación c.709-1G>A en el gen de la *GRN* mostraron características clínicas y neuropsicológicas heterogéneas, y de forma frecuente desarrollaron un síndrome corticobasal con la progresión de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reclutamiento de pacientes e información clínica

Un total de 247 pacientes con diagnóstico clínico de demencia frontotemporal (DFT-vc, APNF o demencia semántica) y los síndromes relacionados síndrome corticobasal y parálisis supranuclear progresiva fueron reclutados de los siguientes hospitales de Gipuzkoa entre 1995 y 2008: Hospital Bidasoa, Hospital de Mendaro, Hospital de Zumarraga y Hospital Nuestra Señora de la Asunción y del hospital de referencia Hospital Donostia. Un total de 220 pacientes no tenían mutaciones en *GRN*; 23 presentaban la mutación c.709-1G>A en *GRN* y 4 pacientes eran portadores de otras mutaciones en *GRN* de patogenicidad incierta. Los pacientes portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* fueron seleccionados para el estudio.

El diagnóstico clínico fue considerado primario, secundario o terciario dependiendo del orden de aparición. Se diagnosticó DFT-vc si los síntomas predominantes incluían disfunción ejecutiva, cambios de personalidad, alteración de la conducta, pérdida de empatía, cambio en conducta alimentaria o conductas obsesivo-compulsivas. Se diagnosticó afasia progresiva no fluente si existía una historia de al menos 6 meses de evolución de dificultad con el lenguaje expresivo, caracterizado por al menos 3 de los siguientes: disminución de la fluencia, lenguaje dubitativo o con esfuerzo y dificultad para encontrar palabras o agramatismo. Se diagnosticó síndrome corticobasal si estaban presentes signos de afectación extrapiramidal asimétrica con apraxia prominente, con o sin fenómeno de mano alienígena u otros hallazgos corticales. Los diagnósticos clínicos fueron revisados en reuniones clínicas de neurólogos y neuropsicólogos de acuerdo con dichos criterios. Los síntomas conductuales fueron evaluados mediante una entrevista con el informador del paciente. Las visitas de seguimiento fueron programadas cada 6 meses, aunque en ocasiones, debido al complicado contexto personal y familiar de algunos pacientes, este programa fue difícil de cumplir.

Los familiares a riesgo fueron invitados a participar en un estudio prospectivo longitudinal. El objetivo de este estudio era investigar potenciales factores modificadores del fenotipo y establecer los síntomas precoces de la enfermedad. Un total de 59 sujetos asintomáticos a riesgo fueron analizados para la presencia de la mutación en *GRN*. Un total de 20 asintomáticos a riesgo eran portadores de la

mutación c.709-1G>A en *GRN* y fueron incluidos en el análisis de penetrancia en relación a la edad.

Evaluación neuropsicológica

La evaluación neuropsicológica consistió en una batería de test cognitivos. El estado cognitivo global se evaluó mediante el *Mini-Mental State Examination* (MMSE). La memoria episódica verbal se evaluó utilizando la lista de palabras del *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD). El lenguaje espontáneo se evaluó mediante la entrevista clínica y además los sujetos describieron la lámina de la *Boston Diagnostic Aphasia Examination*, siendo evaluados en función de su fluencia, generación verbal, fonética, articulación, prosodia, contenido y la presencia de parafasias fonéticas o semánticas. La comprensión, repetición y las praxis ideomotoras fueron evaluadas utilizando los subtests correspondientes del Test Barcelona. También evaluamos la fluencia verbal semántica (animales) y fonética (palabras que empiezan por “p”). Las praxis ideomotoras fueron evaluadas mediante el protocolo de CERAD. La función ejecutiva fue evaluada utilizando la *Frontal Assessment Battery*.

Procedimientos moleculares

Se extrajeron muestras de sangre de los pacientes para los estudios genómicos. El ADN fue extraído de células sanguíneas mediante procedimientos estándar. Los procedimientos para la secuenciación del gen de *GRN* utilizados en nuestro laboratorio se han publicado previamente⁸⁴.

Consentimientos de los pacientes

Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes (o cuidadores de los pacientes) y de los individuos asintomáticos, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Donostia.

RESULTADOS

Identificamos la mutación c.709-1G>A en *GRN* en 23 pacientes y 20 individuos presintomáticos pertenecientes a 13 familias, todas ellas de origen vasco. La evaluación clínica y neuropsicológicas de los pacientes portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* se describe en los siguientes párrafos.

Características clínicas

Los datos clínicos detallados estaban disponibles para 21 (14 mujeres y 7 hombres) de los 23 pacientes con la mutación c.709-1G>A en *GRN*. El tiempo medio de seguimiento fue de 4.7 años. Cuatro pacientes fallecieron después de una media de duración de la enfermedad de 4.75 años. La edad de inicio de la enfermedad se presentó con un rango entre 42 y 71 años; la edad media de inicio fue 59.2 ± 7.2 años. Basándonos en estos datos y en la información de 20 portadores asintomáticos de la mutación, construimos una curva de estimación de la penetrancia en función de la edad para esta mutación en *GRN*. Este análisis mostró que el 37% de los portadores estaban afectados a la edad de 60 años, mientras que el 87% de los portadores estaban afectados para la edad de 70 años (Figura 1). Es notable el caso de una mujer de 82 años de edad, hermana de la paciente 13. Los familiares consultaron preocupados por la historia familiar de la enfermedad, pero ella no presentaba ningún síntoma conductual ni cognitivo y no tenía ningún problema para realizar las actividades de la vida diaria. La valoración neuropsicológica mostró leves déficits atencionales, impulsividad y leve disfunción ejecutiva. Estos déficits han permanecido estables después de un año de seguimiento. El estudio genético ha confirmado que es una portadora de la mutación c.709-1G>A en *GRN*.

El primer síndrome clínico diagnosticado en estos pacientes fue el de DFT-vc en 11 pacientes (52.4%), afasia progresiva no fluente (APNF) en 5 (23.8%), probable enfermedad de Alzheimer en 3 (14.3%), enfermedad de Parkinson en 1 (4.8%) y síndrome de Gerstmann en otro paciente (4.8%). Catorce pacientes desarrollaron un segundo síndrome. En 9 de ellos este diagnóstico secundario fue de síndrome corticobasal (SCB)= (64.3%). El diagnóstico secundario se hizo dentro de los primeros dos años después del diagnóstico inicial en 13 pacientes (61.9%). En general, el síndrome de DFT-vc fue hecho en 14 pacientes (66.4%), SCB en 10 (47.6%) y APNF en 7 pacientes (33.3%). Hasta la fecha solamente 3 pacientes han desarrollado un tercer síndrome clínico. Ningún paciente ha desarrollado síntomas o signos consistentes con el diagnóstico de esclerosis lateral amiotrófica / enfermedad de motoneurona. Existen datos clínicos detallados para 8 de los 11 pacientes que desarrollaron SCB en algún momento de la enfermedad. Los síntomas motores afectaron al lado izquierdo en un 75% y al lado derecho en un 25%. Todos tenían rigidez y apraxia ideomotora del miembro afectado. Se observaron mioclonías

espontáneas o inducidas en un 62.5%. Otros signos corticales como agrafestesia, astereognosia o fenómeno de mano alienígena fueron menos prevalentes, observándose solamente en un 25%. Las características demográficas y generales y la historia familiar de los pacientes con la mutación c.709-1G>A en *GRN* están resumidos en la Tabla 1.

Características conductuales

Se obtuvieron datos sobre la afectación conductual de 18 pacientes. La Tabla 2 resume los trastornos conductuales más significativos durante el seguimiento. El hallazgo más frecuente fue la presencia de apatía en un 88.9% de los pacientes. La impulsividad estaba presente en un 77.8% de los pacientes, seguida de alteración en los hábitos alimentarios con hiperoralidad, bulimia o comida compulsiva en un 55.5%, y desinhibición en un 50%. La irritabilidad o agresividad aparecieron en algún momento a lo largo de la enfermedad en un 16.7% de los pacientes. Solamente un paciente (5.6%) tuvo alucinaciones visuales al inicio de la enfermedad.

Características neuropsicológicas

Once pacientes fueron evaluados mediante una exploración neuropsicológica detallada. Aquí nos centramos en la primera evaluación neuropsicológica que se realizó entre 6 meses y 3.5 años después de los síntomas iniciales de la enfermedad. La puntuación del MMSE varió ampliamente entre 5 y 29 puntos, con una media de 19.73 ± 7.63 puntos. La fluencia verbal semántica (animales en un minuto) también varió ampliamente entre 1 y 21. Todos los pacientes tuvieron algún grado de disfunción ejecutiva, independientemente del síndrome clínico diagnosticado antes de la evaluación neuropsicológica.

Encontramos alteración del lenguaje en la primera evaluación neuropsicológica en todos los pacientes menos en uno. Cuatro pacientes diagnosticados de APNF mostraron un lenguaje no fluente, con esfuerzo y habla dubitativa. Observamos parafasias fonéticas en tres de ellos y ecolalia en dos. Los principales signos observados en los pacientes que no tenían un diagnóstico de APNF fueron anomia leve o una disminución en la producción del lenguaje consistente con afasia adinámica.

Cuatro pacientes mostraron disfunción de memoria episódica de tipo frontal, caracterizada por alteración en la codificación y evocación que se beneficiaba significativamente con claves semánticas. Dos pacientes tuvieron alteración de memoria episódica de tipo hipocampal con alteración del almacenamiento y que no se beneficiaban de las claves semánticas. Dos pacientes presentaron alteración de memoria con afectación de la evocación. Finalmente, dos pacientes no presentaron alteración de memoria en la primera evaluación, y la memoria no fue posible de evaluar en el paciente restante. Estos datos están resumidos en la Tabla 3.

Nueve pacientes (81.8%) mostraron signos de disfunción del lóbulo parietal incluyendo apraxia ideomotora, apraxia constructiva, disgrafía, discalculia o heminegligencia. Estos signos de afectación parietal fueron más evidentes en pacientes con un diagnóstico de SCB en el momento de la evaluación neuropsicológica. La disfunción parietal fue más marcada en los pacientes con un mayor tiempo de evolución de la enfermedad en el momento de la evaluación neuropsicológica. Estos datos están resumidos en la Tabla 4.

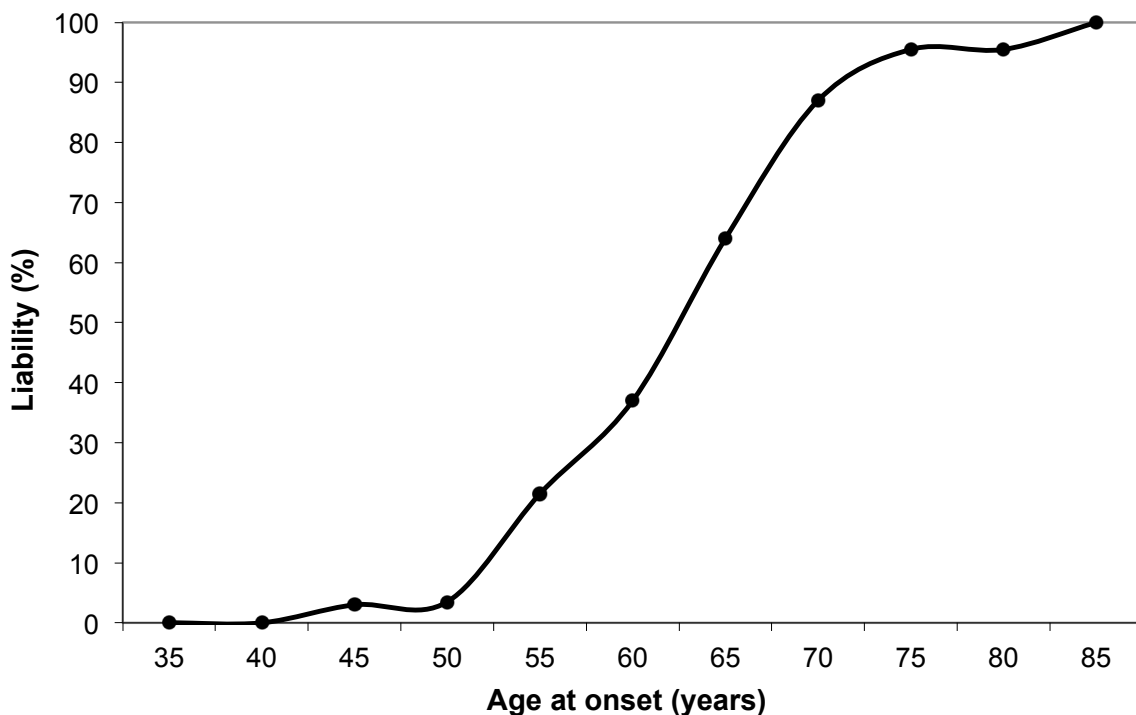


Figura 1. Penetrancia estimada en relación a la edad para la mutación c.709-1G>A en *GRN*

Tabla 1. Características clínicas generales y demográficas de 21 pacientes portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*

	Sexo	Edad de inicio (años)	Historia familiar	Diagnóstico primario	Diagnóstico secundario	Diagnóstico terciario	Duración (años)
Caso 1	M	61	Sí (demencia sin claro patrón de transmisión)	EA (7)	SCB (29) (I)	-	4
Caso 2	M	52	Sí (hermana ELA)	Síndrome de Gerstmann (35)	EA (38)	-	7 (†)
Caso 3	F	66	Sí (AD)	APNF (2)	SCB (26)	-	8
Caso 4	F	63	Sí (AD)	DFTvc (3)	SCB (19) (I)	-	3
Caso 5	M	70	Sí (AD)	DFTvc (14)	APNF (14)	SCB (23) (D)	2
Caso 6	F	70	Sí (AD)	APNF (11)	DFTvc (14)	-	3
Caso 7	F	63	Sí (AD)	DFTvc (9)	SCB (17) (I)	APNF (25)	6
Caso 8	M	53	Sí (AD, incluye DFT-ELA)	APNF (26)	SCB (26) (I)	-	4 (†)
Caso 9	F	71	Sí (AD)	EA (17)	SCB (37)	-	4 (†)
Caso 10	F	54	Sí (AD)	DFTvc (6)	-	-	1
Caso 11	M	51	Sí (AD)	DFTvc (13)	-	-	1
Caso 12	F	53	Sí (AD)	DFTvc (6)	-	-	2
Caso 13	F	57	Sí (AD)	DFTvc (49)	SCB (60)	-	13
Caso 14	M	56	Sí (AD)	DFTvc (40)	-	-	5
Caso 15	F	66	Sí (AD)	APNF (12)	SCB (65) (D)	-	6
Caso 16	F	64	Sí (hermana probable EA)	DFTvc (32)	-	-	9
Caso 17	M	60	Sí (AD)	EP (14)	SCB (30) (I)	-	4 (†)
Caso 18	F	63	Sí (AD)	APNF (20)	DFTvc (43)	-	6
Caso 19	F	57	Sí (patrón de transmisión no claro)	DFTvc (12)	-	-	3
Caso 20	F	62	Sí (AD)	EA (12)	DFTvc (37)	SCB (42) (I)	7
Caso 21	F	42	No (madre trastorno psiquiátrico no especificado)	DFTvc			

AD patrón de transmisión autosómico dominante. Diagnósticos: APNF = afasia progresiva no fluente; DFT-vc = variante conductual de la demencia frontotemporal; EA = enfermedad de Alzheimer; EP: enfermedad de Parkinson; SCB: síndrome corticobasal; D = derecho; I = izquierdo. Los meses desde los síntomas iniciales hasta el diagnóstico se representan entre paréntesis. † = pacientes fallecidos.

Tabla 2. Características conductuales

	<i>Sexo / Edad de inicio</i>	<i>Apatía</i>	<i>Irritabilidad / Agresividad</i>	<i>Desinhibición</i>	<i>Impulsividad</i>	<i>Hiperoralidad / Bulimia / Comida compulsiva</i>	<i>Otras conductas compulsivas</i>	<i>Alucinaciones / Delirios</i>	<i>Depresión</i>	<i>Ansiedad</i>
<i>Caso 1</i>	M / 61	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Caso 2</i>	M / 52	-	+	-	-	-	-	-	-	++
<i>Caso 4</i>	F / 66	-	++	++	+++	-	-	-	-	++
<i>Caso 5</i>	F / 63	+++	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Caso 6</i>	F / 70	++	-	+	+++	+++	-	-	-	-
<i>Caso 7</i>	F / 63	++	-	++	++	+	-	-	+	-
<i>Caso 8</i>	M / 53	++	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Caso 10</i>	F / 54	++	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Caso 11</i>	M / 51	++	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Caso 12</i>	F / 53	++	-	+	++	+++	+	-	-	+
<i>Caso 13</i>	F/57	++	+	-	++	++	-	+	-	-
<i>Caso 14</i>	M / 56	+++	-	-	+	++	-	-	-	-
<i>Caso 15</i>	F / 66	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Caso 16</i>	F / 64	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caso 17</i>	M / 60	++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caso 18</i>	F / 63	+	-	-	++	-	-	-	-	-
<i>Caso 19</i>	F / 57	+++	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Caso 20</i>	F / 62	++	-	-	+	++	-	-	++	++

+ = leve, ++ = moderado, +++ = grave.

Tabla 3. Características neuropsicológicas

	<i>Tiempo hasta la evaluación (años)</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>MMSE</i>	<i>Fluencia semántica</i>	<i>FAB</i>	<i>Disfunción ejecutiva</i>	<i>Afectación mnésica</i>	<i>Trastornos del lenguaje y habla</i>
<i>Caso 1</i>	2.5	EA-SCB	14	3	5	+++	Tipo frontal	Disminución generación lenguaje
<i>Caso 2</i>	3	Sd Gerstmann-EA	24	8	-	++	Tipo hipocampal	Anomia leve y disgrafía
<i>Caso 4</i>	1	DFTvc	25	14	18	+	Tipo hipocampal	Normal
<i>Caso 5</i>	1	DFTvc-APNF	23	10	15	+	Alteración evocación	No fluente, anomia, dubitativo, parafasias fonéticas y disgrafía
<i>Caso 8</i>	1	APNF-SCB	18	7	-	+	Tipo frontal	Tartamudeante, con esfuerzo, parafasias fonéticas y anomia
<i>Caso 10</i>	0.5	DFTvc	27	16	11	++	Normal	Anomia y disminución generación
<i>Caso 11</i>	1	DFTvc	29	21	18	++	Alteración evocación	Leve anomia
<i>Caso 12</i>	0.5	DFTvc	24	7	12	++	Normal	Leve anomia
<i>Caso 14</i>	3.5	DFTvc	19	5	6	+++	Tipo frontal	Anomia
<i>Caso 15</i>	1.5	APNF	5	1	3	++	Tipo frontal	No fluente, anomia, parafasias fonéticas, ecolalia, alteración en comprensión de frases y repetición y disgrafía
<i>Caso 18</i>	2.5	APNF	9	1	-	++	No valorable	No fluente, anomia, ecolalia, palilalia y disgrafía

APNF = afasia progresiva no fluente; DFTvc = demencia frontotemporal variante conductual; EA = enfermedad de Alzheimer; SCB = síndrome corticobasal; FAB = *Frontal Assessment Battery*; MMSE = *Mini-Mental State Examination*; + = leve, ++ = moderado, +++ = grave.

Tabla 4. Datos de afectación parietal en la primera evaluación neuropsicológica de 11 portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*

	Tiempo hasta la evaluación (años)	Diagnóstico	Praxis ideomotoras derechas	Praxis ideomotoras izquierdas	Praxis manuales bilaterales	Apraxia constructiva gráfica (CERAD)	Disgrafía	Discalculia	Heminegligencia
Caso 1	2.5	EA-SCB	8/10	5/10	2/8	0/11	Sí (no especificada)	0/5	Sí (I)
Caso 2	3	Sd Gerstmann- EA	9/10	10/10	6/8	7 /11	Sí (alteración <i>buffer</i> grafémico)	0/5	No
Caso 4	1	DFTvc	10/10	10/10	8/8	9/11	No disgrafía	3/5	No
Caso 5	1	DFTvc-APNF	10/10	10/10	6/8	11/11	Sí (omisión de grafemas)	4/5	No
Caso 8	1	APNF-SCB	10/10	6/10	6/8	10/11	No disgrafía	1/5	Sí (I)
Caso 10	0.5	DFTvc	10/10	10/10	6/8	11/11	No disgrafía	2/5	No
Caso 11	1	DFTvc	10/10	10/10	8/8	11/11	No disgrafía	5/5	No
Caso 12	0.5	DFTvc	10/10	10/10	8/8	7/11	No disgrafía	3/5	No
Caso 14	3.5	DFTvc	8/10	10/10	6/8	11/11	No disgrafía	2/5	No
Caso 15	1.5	APNF	6/10	6/10	5/8	4/11	Sí (no especificada)	0/5	No
Caso 18	2.5	APNF	5/10	3/10	4/8	Sí	Sí (omisión de grafemas)	1/5	No

APNF = afasia progresiva no fluente; DFTvc = demencia frontotemporal variante conductual; EA = enfermedad de Alzheimer; SCB = síndrome corticobasal.

DISCUSIÓN ACTUALIZADA

En este trabajo se realiza una caracterización fenotípica detallada de los aspectos demográficos, clínicos, conductuales y neuropsicológicos de una serie de 21 pacientes de origen vasco portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*. En esta caracterización se llama la atención sobre la variabilidad en el cuadro clínico (edad de inicio, diagnóstico clínico), la relativa rápida progresión de la enfermedad y la evolución habitual desde un diagnóstico sindrómico inicial o primario a diagnósticos secundarios o terciarios con la evolución. Curiosamente, este diagnóstico secundario o terciario, fue de síndrome corticobasal en casi un 65% de los casos. Desde el punto de vista conductual, la apatía fue el síntoma más común, y desde el punto de vista neuropsicológico, aunque la disfunción ejecutiva en relación a una afectación frontal aparecía en todos los pacientes, también se evidenciaban datos de afectación parietal, como apraxia ideomotora, constructiva gráfica, disgrafía, discalculia o heminegligencia hasta en un 80% de los pacientes en una primera valoración neuropsicológica, lo que de alguna forma caracteriza a la DFT-*GRN* frente a otras formas de DFT, como ha sido refrendado por otros autores⁹⁸. La edad media de inicio de la enfermedad en nuestra serie era de 59.2 ± 7.2 años. Tomando como referencia la información de los pacientes y de 20 portadores asintomáticos de la mutación c.709-1G>A en *GRN*, construimos una curva para estimar la penetrancia de la mutación, que mostraba que el 37% de los portadores habían desarrollado la enfermedad a los 60 años, mientras que el 87% de los portadores estaban afectados para los 70 años. Esta curva de estimación de la penetrancia mostraba una menor proporción de portadores de la mutación afectados a los 60 años, si la comparáramos con estimaciones realizadas en otras series de portadores de mutaciones en *GRN*^{48,73}. Esta diferencia puede deberse a una diferencia real en la penetrancia en relación con la edad entre diferentes mutaciones en *GRN*, aunque puede deberse también a sesgos debidos al pequeño tamaño muestral, selección de casos exclusivamente con antecedentes familiares, exclusión de sujetos “a riesgo” que no participaron en los análisis, etc. En nuestra serie ningún sujeto desarrolló enfermedad de motoneurona, aunque había dos pacientes que refirieron antecedentes familiares de enfermedad de motoneurona. El desarrollo de enfermedad de motoneurona asociado a DFT se ha reportado de forma excepcional en sujetos portadores de mutaciones en *GRN*⁴⁹, pero en un estudio colaborativo internacional se identificó en un 5.4% de los pacientes, por lo que se concluye que la EMN puede aparecer en algunos sujetos con DFT-*GRN*⁹⁹.

ESTUDIO 2

RESUMEN

El polimorfismo en el codón 129 de la proteína priónica modifica la edad de inicio de la demencia frontotemporal con la mutación c.709-1G> en progranulina

La degeneración lobar frontotemporal causada por mutaciones en el gen de la progranulina (*GRN*) presenta una elevada variabilidad en la edad de inicio y el fenotipo clínico de la enfermedad. Los factores que influyen en esta variabilidad no son bien conocidos. El objetivo de nuestro estudio era determinar si determinadas variables genéticas seleccionadas modificaban la edad de inicio de nuestra serie de 21 pacientes, todos ellos de origen vasco, portadores de una única mutación tipo *splicing* (c.709-1G>A) en el gen *GRN*. En nuestro análisis incluimos las siguientes variables genéticas: polimorfismos rs5848 y rs9897526 en *GRN*, *APOE*, genotipo de la proteína tau asociada a microtúbulos (*MAPT*), y el polimorfismo del codón 129 en el gen *PRNP*. No encontramos asociación entre los polimorfismos de *GRN*, *APOE* y proteína tau asociada a microtúbulos con la edad de inicio de la enfermedad, mientras que encontramos evidencia de una asociación entre el polimorfismo del codón 129 de *PRNP* y la edad de inicio de la enfermedad en pacientes con demencia frontotemporal-PGRN(+). Los portadores homocigotos MM presentaban una edad de inicio media 8.5 años menor que los pacientes portadores de al menos una valina en su codón 129 de *PRNP* (MV o VV). La justificación biológica de esta asociación es especulativa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Los pacientes fueron reclutados desde la Unidad de Deterioro Cognitivo del Hospital Donostia, un centro terciario de referencia. Incluimos pacientes con la mutación c.709-1G>A en *GRN*. Todos los pacientes fueron diagnosticados con un síndrome del complejo DFT y eran de origen vasco. Las características clínicas y neuropsicológicas de la serie se han publicado previamente⁸⁴. Consideramos la edad de inicio de la enfermedad cuando el informador refería haber observado los primeros síntomas de la enfermedad en una entrevista clínica detallada.

Genotipado

El ADN se extrajo de células sanguíneas mediante procedimientos estándar después de haber obtenido consentimiento informado del participante o familiar. Los procedimientos de secuenciación de *GRN* en nuestro laboratorio han sido publicados previamente⁸⁴. Los genotipos *APOE* y *MAPT* fueron analizados según lo descrito en Blazquez et al.¹⁰⁰ y Baker et al.¹⁰¹, respectivamente. Para analizar el codón 129 del gen *PRNP* un fragmento de 385 bp de *PRNP* se amplificó utilizando *primers* diseñados por nosotros (*PRNP Forward* 5'-GCCAAAAACCAACATGAAGC3' y *PRNP Reverse primer* 5'-CATGCTCGATCCTCTCTGG-3'). El fragmento obtenido fue digerido por la endonucleasa *BsaI* que corta si hay una valina en el codón 129.

Análisis estadístico

Las variables categóricas se describen mediante frecuencias absolutas y relativas y se compraron mediante el test χ^2 . Para estudiar la asociación linear entre variables continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson y para cada grupo considerado, la distribución normal de las variables se comprobó utilizando el test de Shapiro-Wilks. El test de análisis de varianzas o el test de Welch, según se requiriera, se utilizó para analizar la igualdad de medias. El estimador de densidad de Kernel se utilizó para estimar la función de probabilidad. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico R, versión R 2.6.1.

RESULTADOS

Para este estudio incluimos 21 pacientes con la mutación c.709-1G>A en *GRN* procedentes de 13 familias. Catorce eran mujeres y 7 hombres, y la edad media de inicio de la enfermedad estaba entre 42 y 70 años (media \pm desviación estándar = 59.2 \pm 7.2 años). Esta variable mostró una distribución bastante simétrica con una media de 61 años. No encontramos diferencias significativas en la edad de inicio entre hombres y mujeres (hombres 57.4 \pm 6.8 años vs. mujeres 60.1 \pm 7.5 años, $p = 0.432$) o entre los diferentes síndromes clínicos de diagnóstico de presentación ($p = 0.22$).

La distribución de los polimorfismos y haplotipos estudiados se resume en la Tabla 1. La edad de inicio de la demencia no estaba asociado con los polimorfismos

rs5848 ($p = 0.591$) o rs9897526 ($p = 0.654$) en el gen de la *GRN*. Tampoco encontramos que la edad de inicio de la enfermedad estuviese afectada por el haplotipo *MAPT* o el status de *APOE* cuando comparamos el grupo portador de al menos un alelo *APOE* $\epsilon 4$ con otras variantes de *APOE* (portadores *APOE* $\epsilon 4$, 61 ± 7.4 años vs. no portadores *APOE* $\epsilon 4$, 59.9 ± 6.2 años, $p = 0.756$).

Las comparaciones con el test de la varianza mostraron diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes clasificados en función de su status en el codón 129 del gen *PRNP* (MM, MV y VV, $p = 0.043$). Específicamente, los grupos MV y VV eran comparables en cuanto a la edad de inicio de la enfermedad (MV 61.7 ± 6.28 años vs. VV 61.7 ± 5.85 años). Dados estos resultados comparamos el grupo de pacientes con al menos una valina en su codón 129 (MV y VV) frente al grupo MM. Los pacientes homocigotos MM presentaron de media una edad de inicio de la enfermedad 8.5 años más temprana que los pacientes con al menos una valina en su codón 129 del gen *PRNP* (MM 53.2 ± 7.11 años vs. MV-VV 61.7 ± 5.9 años, $p = 0.011$) (Figura 1).

Tabla 1. Distribución de los genotipos analizados, grupos diagnósticos y edad de inicio de la enfermedad.

VARIABLES ANALIZADAS	Genotipo	N	Edad de inicio (media ± DE)
rs5848	CT	9	58.2 ± 6.2
	CC	12	60 ± 8.1
rs9897526	GG	19	59 ± 7.5
	GA	2	61.5 ± 6.4
APOE	ε2ε3	1	70
	ε3ε3	15	59.3 ± 5.7
	ε3ε4	4	61 ± 7.4
MAPT	H1H1	9	56.9 ± 8.3
	H1H2	11	60.3 ± 5.6
	H2H2	1	70
PRNP 129	MM	6	53.2 ± 7.1
	MV	9	61.7 ± 6.3
	VV	6	61.7 ± 5.8
Diagnóstico inicial	DFTvc	11	57 ± 7.51
	APNF	5	62.8 ± 6.72
	EA	3	64 ± 5.19
	EP	1	60
	Síndrome Gerstmann	1	52

APNF: afasia progresiva no fluente; DFTvc: variante conductual de la demencia frontotemporal; EA: enfermedad de Alzheimer; EP: enfermedad de Parkinson.

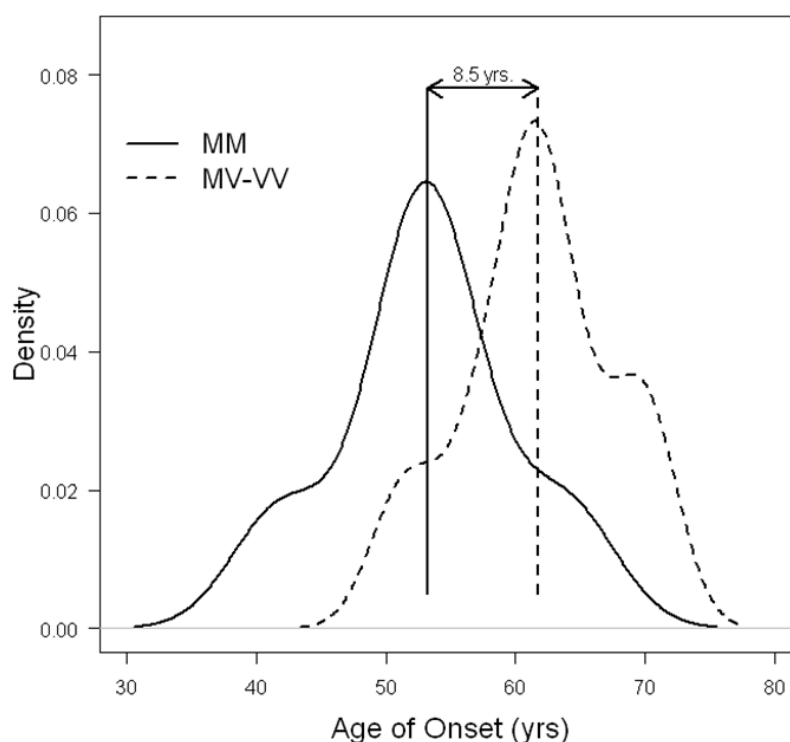


Figura 1. Distribución de la edad de inicio de la enfermedad de los casos MM en codón 129 del gen PRNP comparado con el grupo MV-VV.

DISCUSIÓN ACTUALIZADA

La gran variabilidad en la edad de inicio de la enfermedad en pacientes con DFT por mutaciones en el gen de la *GRN* hace pensar que existen factores genéticos o ambientales adicionales responsables de esta variabilidad. Previamente a la publicación de este artículo los estudios al respecto eran muy escasos. Se habían estudiado factores genéticos que modifican el fenotipo en otras enfermedades neurodegenerativas como el haplotipo H1/H2 del gen *MAPT*, el alelo del gen *APOE*, y otros polimorfismos en el alelo no mutado del gen de la *GRN*. El haplotipo del gen *MAPT* parece no tener influencia en la edad de inicio en DFT-*GRN*^{48,73,102}, aunque un estudio mostró que los sujetos con la mutación en *GRN* Leu271LeufsX10 y el haplotipo H1H2 en *MAPT* tienen una edad de inicio más precoz que los portadores del haplotipo H2H2⁷⁸. La presencia de al menos un alelo *APOE* ϵ 4 se ha asociado con un retraso en la edad de inicio en algunas series^{48,74}, pero no en otras^{73,102}. Por último, la presencia del alelo A en rs9897526, un polimorfismo en el alelo no mutado de *GRN* se ha

asociado con un retraso en la edad de inicio en familias con la mutación Arg493X en *GRN*⁷³.

Posteriormente a la publicación de este artículo han aparecido nuevos estudios que muestran que el gen *TMEM106B*, que codifica para la proteína transmembrana TMEM106B, actúa como factor modificador en DFT-*GRN*. La frecuencia del alelo menor (C) en el polimorfismo rs1990622 está disminuida en los sujetos con DFT-*GRN* sugiriendo un efecto protector de este alelo menor^{38,39}. La presencia del alelo más frecuente (T) está asociada con una edad de inicio más precoz en portadores de mutaciones en *GRN* y explica parte de la variabilidad clínica en DFT-*GRN*^{38,39}. Todavía no está totalmente esclarecida la relación exacta entre los polimorfismos en *TMEM106B* y la regulación de la función de la proteína TMEM106B. Se ha demostrado que el polimorfismo rs1990622 está en perfecto desequilibrio de ligamiento con p.T185S (rs3173615), una variante codificante de TMEM106B. La isoforma S185 (serina) de TMEM106B sería protectora, y se expresa a niveles más bajos que la isoforma T185, por un incremento de la tasa de degradación proteica¹⁰³. Aunque TMEM106B es una proteína pobremente caracterizada, recientes publicaciones indican que se trata de una glicoproteína transmembrana tipo II, predominantemente localizada en la membrana de endosomas tardíos / lisosomas, donde puede interactuar con la PGRN intracelular^{104,105}.

En nuestro artículo analizamos los factores previamente descritos como potenciales modificadores del fenotipo DFT-*GRN*, pero además incluimos en el análisis el polimorfismo rs5848 en *GRN* y el polimorfismo en el codón 129 del gen de la proteína priónica (*PRNP*). El alelo T en rs5848 de *GRN* podría ser un factor de riesgo para DFT esporádica¹⁰⁶, aunque no parece modificar la edad de inicio en DFT-*GRN*⁷³. El polimorfismo en el codón 129 de *PRNP* (metionina/valina) es un potente modificador del fenotipo en las enfermedades por priones, constituyendo un factor de susceptibilidad para la enfermedad y un factor modulador del fenotipo. En general, los individuos heterocigotos (MV) tienen menor susceptibilidad a la enfermedad y presentan una edad de inicio mayor que los homocigotos (MM o VV), siendo los individuos homocigotos MM los más susceptibles para las diferentes categorías de enfermedades por priones. Esta mayor susceptibilidad de los individuos homocigotos, sobre todo MM, presenta su máxima expresión en el caso de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob¹⁰⁷. Por ello, se ha sugerido que el polimorfismo en el codón 129 de *PRNP* podría ser un factor modificador en otras enfermedades

neurodegenerativas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), los resultados son algo contradictorios, con algunos estudios que encuentran una asociación entre polimorfismos en *PRNP* y el riesgo de EA^{108,109}, pero no en otros^{110,111,112}. En un interesante estudio analizando el riesgo de *APOE* y *PRNP* para la EA, los autores concluyen que pueden existir interacciones complejas y sinergias entre los diferentes factores de riesgo que pueden explicar las divergencias en los resultados de estudios previos¹¹³. También se ha descrito la posible influencia del polimorfismo en el codón 129 de *PRNP* y otros fenotipos clínicos más heterogéneos, como el de la afasia progresiva primaria en el que puede actuar como modulador del fenotipo¹¹⁴. Hasta el momento no se había encontrado una asociación significativa entre el polimorfismo en el codón 129 de *PRNP* y la demencia frontotemporal¹¹⁵.

En nuestro estudio no encontramos asociación entre la edad de inicio y los genotipos estudiados de *MAPT*, *APOE* ni *GRN*, pero sí encontramos una asociación con el genotipo en *PRNP*, de forma que los sujetos con la mutación c.709-1G>A en *GRN* y el polimorfismo MM en el codón 129 de *PRNP* presentaron una edad de inicio 8.5 años más precoz que los pacientes portadores de al menos una valina (MV o VV). Entendimos que se trataba de una muestra pequeña y la justificación biológica de esta asociación era especulativa, por lo que se trata de un estudio “generador de hipótesis” que debería replicarse en series más amplias de DFT-*GRN*. Curiosamente, en un estudio publicado posteriormente en 2014 para analizar los factores genéticos potencialmente modificadores del fenotipo en sujetos con la expansión en el gen *C9ORF72*, los autores demuestran una asociación entre el polimorfismo en el codón 129 de *PRNP* y la edad de inicio de la enfermedad en la misma dirección que la descrita por nosotros en sujetos portadores de la mutación en *GRN*¹¹⁶. Estos resultados refuerzan un papel más general del polimorfismo del codón 129 de *PRNP* en la susceptibilidad o modificación fenotípica de diferentes procesos neurodegenerativos.

ESTUDIO 3

RESUMEN

Características neuropsicológicas de portadores asintomáticos de la mutación c.709-1G>A en progranulina

Las mutaciones en el gen de la progranulina (*GRN*) se han identificado como una causa de demencia frontotemporal (DFT). Sin embargo, poco se sabe acerca de las capacidades neuropsicológicas de los portadores asintomáticos de estas mutaciones. El objetivo de este estudio era evaluar la función cognitiva en portadores asintomáticos de la mutación c.709-1G>A en *GRN*. Establecimos la hipótesis de que podría existir un rendimiento neuropsicológico peor antes del desarrollo de síntomas clínicos significativos de DFT. Participaron 32 familiares de primer grado asintomáticos de pacientes con DFT portadores de la mutación c.709-1G>A, incluyendo 13 portadores de la mutación en *GRN* (A-*GRN*+) y 19 no portadores (*GRN*-). Se les evaluó mediante una batería neuropsicológica. Encontramos que los participantes A-*GRN*+ presentaron unas puntuaciones significativamente peores que los sujetos *GRN*- en pruebas de atención (*Trail Making Test* Parte A), flexibilidad mental (*Trail Making Test* Parte B), y lenguaje (Test de Denominación de Boston). El peor rendimiento en estas pruebas en los sujetos asintomáticos portadores de la mutación en *GRN* podría reflejar una fase prodrómica que precede al inicio de los síntomas clínicamente significativos de DFT.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio y diseño

Entre 1995 y 2008 se identificaron 23 pacientes con DFT portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* en el Hospital Donostia, un centro terciario de referencia. Los familiares de primer grado de dichos pacientes fueron invitados a participar en un estudio prospectivo longitudinal para investigar las características neuropsicológicas precoces de la enfermedad. Los criterios de exclusión fueron: (i) antecedentes de enfermedades neurológicas (enfermedad cerebrovascular u otra enfermedad neurológica) o enfermedad psiquiátrica importante (esquizofrenia, depresión mayor o trastorno bipolar), (ii) uso de drogas o sustancias tóxicas que pudieran interferir con la función cognitiva, y (iii) cociente intelectual estimado mediante el test WAIS-III abreviado < 85. Los sujetos fueron entrevistados por un clínico

experimentado y no se detectaron cambios recientes en la función cognitiva o en la conducta.

Treinta y dos individuos procedentes de cinco familias cumplieron los criterios de inclusión sin presentar criterios de exclusión y formaron parte del estudio. Los participantes fueron divididos en dos grupos: portadores de la mutación en *GRN* asintomáticos (*A-GRN+*; n = 13) y familiares no portadores (*GRN-*; n = 19). No había diferencias significativas entre los grupos en edad, educación, cociente intelectual estimado o género.

Procedimientos moleculares

El ADN se extrajo de células sanguíneas mediante procedimientos estándar. La posición del nucleótido c.709-1G>A fue genotipada mediante PCR-RFLP: un fragmento de 373 bp se amplificó utilizando *primers GRN 7F* y *GRN 7R* como se ha descrito previamente^{1,2}, y esto fue seguido por restricción enzimática utilizando *HaeIII* (New England Biolabs, USA).

Evaluación neuropsicológica

Todos los test neuropsicológicos fueron administrados por una neuropsicóloga experimentada ciega para el status genético del participantes. Las pruebas neuropsicológicas fueron seleccionadas para evaluar la inteligencia global y el estado cognitivo general, atención, función ejecutiva, lenguaje, memoria y funciones visuoespaciales.

La inteligencia global fue evaluada utilizando una forma abreviada de la *Wechsler Adult Intelligence Scale* (WAIS-III), incluyendo los subtests Vocabulario, Similitudes, Diseño de Bloques, Aritmética y Ensamblaje de Objetos. La atención se midió utilizando el Índice de Variabilidad del test *Continuous Performance Test* (CPT) y el tiempo en completar el *Trail-Making Test* Parte A (tiempo TMT-A). La función ejecutiva fue evaluada mediante el test *Wisconsin Card Sorting Test* (WCST-64), tiempo para completar el *Trail-Making Test* Parte B (tiempo TMT-B), Semejanzas y Aritmética del WAIS-III, fluencia verbal fonética (número de palabras que comienzan por “p” en un minuto), y el *Iowa Gambling Test* (IGT). Debido a que estas pruebas evalúan diferentes capacidades dentro de las funciones ejecutivas, el dominio de función ejecutiva fue a su vez subdividido en tres subdominios. El *shifting* cognitivo incluyó el tiempo de TMT-B y número de errores perseverativos del WCST-64; el

razonamiento y formación de conceptos incluyó los subtests Semejanzas y Aritmética del WAIS-III, nivel de respuestas conceptuales del WCST-64 y fluencia verbal fonética; y por último, la toma de decisiones fue evaluada mediante la puntuación total del IGT. Las capacidades lingüísticas fueron evaluadas mediante el Test de Denominación de Boston abreviado, subtest de Vocabulario del WAIS-III y fluencia verbal semántica (número de animales en un minuto). La memoria episódica verbal fue evaluada utilizando el test de aprendizaje verbal del *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD). Finalmente, las habilidades visuoespaciales fueron evaluadas utilizando el Diseño de Bloques y Ensamblaje de Objetos del WAIS-III.

Análisis estadístico

Realizamos el análisis de los datos utilizando SPSS (versión 19.00). Las puntuaciones neuropsicológicas individuales fueron transformadas en puntuaciones Z utilizando datos normativos publicados por el equipo del estudio NEURONORMA y de los manuales de los test empleados. Las puntuaciones compuestas para cada dominio fueron calculadas promediando las puntuaciones Z medias de los test individuales dentro de cada dominio. Para la comparación de las medias entre grupos se utilizó el test *t* de Student. Para superar la limitación del relativo pequeño tamaño muestral, se calcularon también los valores *d* de Cohen, como una estimación del tamaño del efecto para la comparación entre grupos. Los valores *d* de Cohen cerca de 0.2 fueron considerados pequeños, 0.5 moderados y por encima de 0.8 fueron considerados elevados.

Protocolo de aprobación y consentimiento informado de los participantes

Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Donostia.

RESULTADOS

Se reclutaron para este estudio 32 individuos (17 mujeres y 15 hombres) procedentes de cinco familias identificadas con DFT-GRN (10 participantes de la familia 1, 12 de la familia 2, 4 de la familia 3, 4 de la familia 4 y 2 de la familia 5). Un sujeto fue excluido por haber presentado enfermedad cerebrovascular previa. No había ningún otro sujeto elegible que cumpliera criterios de exclusión. De estos 32 participantes, 13 sujetos eran portadores asintomáticos de mutación en GRN (A-GRN+) y 19 eran familiares no portadores (GRN-). Los grupos eran comparables en

edad [media (DE) = 49.89 (12.75) y 52 (13.07)], sexo (6 vs. 9 hombres) y años de educación [media (DE) = 15.423 (3.32) y 15.00 (3.36)]. No había diferencias significativas entre los grupos A-GRN+ y GRN- en el cociente intelectual estimado (WAIS-III).

Comparación neuropsicológica entre grupos

Los resultados de los dominios compuestos y los test neuropsicológicos (representados mediante puntuaciones Z) se presentan en la Tabla 1.

El grupo A-GRN+ puntuaba peor en tareas relacionadas con el dominio de atención ($t(30) = 3.487$; $p = 0.002$) y el efecto de tamaño asociado con esta diferencia era elevado (d de Cohen = 1.27). No había otras diferencias significativas entre ambos grupos en otros dominios cognitivos compuestos, aunque detectamos alguna diferencia significativa cuando comparamos los rendimientos de ambos grupos en algún test neuropsicológico individual.

El grupo A-GRN+ realizó de una forma significativamente más lenta el test TMT-A ($t(31) = 4.509$; $p < 0.001$) y el TMT-B ($t(30) = 3.494$, $p = 0.002$). Los tamaños de efecto asociado con estas diferencias eran muy elevados (d de Cohen en TMT-A = 1.60, d de Cohen en TMT-B = 1.28). No encontramos diferencias significativas entre los grupos A-GRN+ y GRN- en otros test de atención, frontales o de funciones ejecutivas. El grupo A-GRN+ también rindió significativamente peor en el Test de Denominación de Boston ($t(31) = 2.598$; $p = 0.022$, d de Cohen = 0.93). No hubo diferencias significativas entre grupos en el resto de test realizados. Sin embargo, se observaron tendencias no significativas con tamaños de efecto moderado en varias variables neuropsicológicas. Podrían existir déficits neuropsicológicos leves en portadores asintomáticos detectables con un mayor tamaño de muestra.

Tabla 1. Puntuaciones en dominios compuestos y en test neuropsicológicos (reflejados como puntuaciones Z) en los grupos A-GRN+ y GRN-.

	A-GRN+		GRN-		P
	n	Puntuación Z	n	Puntuación Z	
Atención	12	-0.32 (0.88)	19	0.63 (0.64)	0.002
Variabilidad CPT-II	12	-0.16 (1.27)	19	0.40 (1.05)	0.187
TMT-A	13	-0.43 (0.83)	19	0.86 (0.77)	<0.001
Función ejecutiva					
<i>Subdominio flexibilidad cognitiva</i>	10	-0.30 (0.70)	18	0.19 (0.73)	0.107
TMT-B	12	-0.46 (1.14)	19	0.77 (0.83)	0.002
Perseveraciones WCST-64	10	-0.16 (0.77)	18	-0.33 (1.20)	0.700
<i>Subdominio razonamiento y formación conceptos</i>	10	0.20 (0.76)	18	0.35 (0.73)	0.601
Aritmética (WAIS-III)	13	0.79 (0.84)	19	1.10 (1.10)	0.393
Semejanzas (WAIS-III)	13	0.50 (0.92)	19	0.86 (0.93)	0.294
Fluencia verbal fonética "P"	13	-0.20 (1.11)	19	0.15 (0.68)	0.265
Respuestas nivel conceptual WCST-64	10	-0.62 (0.66)	18	-0.66 (1.10)	0.912
<i>Subdominio Toma de decisiones</i>					
IGT	13	-0.46 (0.67)	18	-0.60 (0.67)	0.560
Lenguaje	13	0.18 (0.78)	19	0.55 (0.48)	0.104
Fluencia verbal semántica	13	1.04 (0.60)	19	0.62 (0.98)	0.182
Vocabulario (WAIS-III)	13	0.49 (0.74)	19	0.72 (0.70)	0.391
Denominación Boston-30	13	-0.99 (1.79)	19	0.32 (0.38)	0.004
Función visoespacial	13	0.23 (0.69)	19	0.36 (0.85)	0.654
Diseño bloques (WAIS-III)	13	0.62 (0.72)	19	0.58 (0.73)	0.880
Rompecabezas (WAIS-III)	13	-0.14 (0.97)	19	0.15 (1.13)	0.445
Memoria					
Recuerdo diferido (CERAD)	11	-0.23 (0.75)	19	0.13 (1.12)	0.293

Los valores son medias desviaciones estándar. CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; CPT-II: Continuous Performance Test; IGT: Iowa Gambling Test; TMT: Trail Making Test (partes A y B); WAIS-III: Weschler Adult Intelligence Scale-III; WCST-64: Wisconsin Card Sorting Test.

DISCUSIÓN ACTUALIZADA

En el artículo 3 analizamos el rendimiento neuropsicológico de sujetos presintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*, frente a sujetos de las mismas familias no portadores de la mutación en *GRN*. No existían estudios previos que analizaran en detalle a series de sujetos presintomáticos portadores de mutaciones en *GRN* desde un punto de vista neuropsicológico. Únicamente había un trabajo centrado en el estudio de neuroimagen funcional de sujetos presintomáticos; los autores no encontraron diferencias en los test neuropsicológicos realizados a sujetos presintomáticos portadores de la mutación en *GRN* frente a los no portadores, aunque estos sujetos fueron evaluados con una breve batería neuropsicológica¹¹⁷. En nuestro estudio encontramos que a pesar de un rendimiento cognitivo normal, los sujetos portadores de la mutación en *GRN* obtuvieron unas puntuaciones significativamente peores en pruebas de atención (*Trail Making Test* parte A), flexibilidad mental (*Trail Making Test* parte B) y lenguaje (Test de Denominación de Boston). Esta peor puntuación en las pruebas puede reflejar una disfunción cognitiva prodrómica, que preceda a los síntomas clínicos más evidentes, en sujetos con DFT-*GRN*. Posteriormente a la publicación de este artículo ha habido otros trabajos en los que no han encontrado diferencias en la comparación directa en pruebas neuropsicológicas entre los portadores de mutaciones en *GRN* y los no portadores^{118,119}. Hallam y colaboradores en un estudio similar al nuestro, con un tamaño de muestra menor, encontraron que los portadores presintomáticos de mutaciones en *GRN* rendían peor que los no portadores en pruebas de función visuoespacial y memoria de trabajo¹²⁰. Por último, se han publicado los resultados de un estudio colaborativo de la iniciativa para el estudio de la demencia frontotemporal genética (GENFI), en el que incluyendo sujetos presintomáticos con diferentes mutaciones en *GRN*, *C9ORF72* y *MAPT*, encuentran las mayores diferencias por un peor rendimiento de sujetos presintomáticos portadores de las mutaciones frente a no portadores, cinco años antes de la edad de inicio esperada. Estas diferencias las encuentran en pruebas de denominación (Test de Denominación de Boston) y función ejecutiva (*Trail Making Test* parte B, span de dígitos inverso y la tarea *Digit Symbol Task*), resultados congruentes con nuestros hallazgos. En este estudio, cuando se consideran solamente los portadores presintomáticos de mutaciones en *GRN*, el test neuropsicológico que mostró diferencias entre portadores y no portadores de la mutación en un tiempo más precoz antes del inicio esperado de la enfermedad fue el span de dígitos inverso¹²¹.

Todos estos estudios sugieren que existen cambios sutiles en el funcionamiento cerebral, que pueden ser detectados mediante evaluaciones neuropsicológicas detalladas, antes del inicio de los síntomas de la enfermedad, cuando hacemos comparaciones entre grupos. Sin embargo, la variabilidad en los resultados de estos trabajos preliminares sugiere que será difícil encontrar pruebas neuropsicológicas individuales que ante un caso único sean capaces de detectar el inicio de la enfermedad en sujetos presintomáticos.

ESTUDIO 4

RESUMEN

Adelgazamiento cortical temporal diferencial en relación con la edad en portadores asintomáticos de mutación en progranulina

Los estudios en portadores asintomáticos de mutaciones en el gen de la progranulina (*GRN*) son esenciales para mejorar nuestro conocimiento del patrón y temporalidad de los cambios cerebrales morfológicos precoces en la degeneración lobar frontotemporal. Los principales objetivos de este estudio eran evaluar el efecto de la edad en los cambios de grosor cortical (*cortical thickness*, CTh) en portadores preclínicos de mutaciones en *GRN*, y estudiar la relación del grosor cortical con el rendimiento cognitivo en portadores de mutaciones en *GRN*. Calculamos los mapas de grosor cortical en 13 portadores asintomáticos de la mutación c.709-1G>A en *GRN* y 13 sujetos sanos pareados por edad y sexo. Los portadores asintomáticos de la mutación en *GRN* presentaban patrones diferentes de adelgazamiento cortical en relación a la edad, en los giros temporal superior y medio derechos, y en el aspecto posterior (Banks) del surco temporal superior bilateralmente, en comparación con los controles. El grosor cortical estaba correlacionado con las puntuaciones en pruebas neuropsicológicas: *Trail Making Test A* y *B* y en el Test de Denominación de Boston. El adelgazamiento cortical en portadores asintomáticos de mutaciones en *GRN* en el córtex temporal lateral sugiere un efecto precoz y específico de la enfermedad en estas áreas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Se incluyeron en el estudio trece sujetos asintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* (procedentes de 6 familias diferentes) y 13 sujetos control. Como grupo control (no portadores) incluimos 9 familiares de primer grado sin la mutación y 4 sujetos control voluntarios. Incluimos estos voluntarios no relacionados con las familias para priorizar el ajuste por edad y sexo, que no era posible únicamente con miembros de las familias de DFT-*GRN*. Se obtuvo consentimiento informado de todos los sujetos antes del reclutamiento, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Donostia.

Evaluación clínica y cognitiva

Los sujetos fueron entrevistados por un clínico experimentado y no se detectaron cambios en su función cognitiva o en su conducta. Además, los participantes no presentaban comorbilidad que pudiera potencialmente influir en la estructura cerebral. A todos los sujetos pertenecientes a las familias DFT-GRN (portadores y no portadores) se les administró una extensa batería de test cognitivos: el *Mini-Mental State Examination*, la versión abreviada del *Wechsler Adult Intelligence Scale III*, *Continuous Performance Test*, span de dígitos, *Trail-Making Test* partes A y B (TMT-A y B), *Wisconsin Card Sorting Test*, fluencia verbal fonética y semántica, *Iowa Gambling Task*, Test de Denominación de Boston, test de aprendizaje verbal del *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*, y el test abreviado *Pictures of Facial Affect*. Todos puntuaron dentro del rango normal en todas las pruebas administradas. En un estudio previo, con el mismo grupo de portadores de mutación en GRN y un grupo control levemente diferente (donde se priorizó el que fueran familiares más que el emparejamiento por edad y sexo) encontramos que los portadores de la mutación en GRN presentaron peores puntuaciones que sus familiares no portadores en TMT-A, TMT-B y en el Test de Denominación de Boston.

Adquisición de imágenes

La resonancia magnética cerebral se realizó en un equipo de 1,5 Tesla (Achieva Nova, Philips), con una alta resolución volumétrica de secuencias “*turbo field echo*” (Adquisición 3D, sagital, ponderado en T1, tiempo de repetición [TR] = 7,2, tiempo de eco [TE] = 3,3, ángulo flip = 8, matriz = 256 x 232, grosor de corte de 1 mm, dimensiones vóxel de 1 mm x 1 mm x 1 mm, [NSA] = 1160). Todas las exploraciones fueron adquiridas en el mismo equipo de RM y no se realizaron actualizaciones de hardware o software del equipo durante el período de estudio.

Procesamiento de las imágenes

Para el procesamiento de imágenes se utilizaron los métodos implementados en el software FreeSurfer (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) para llevar a cabo la reconstrucción de la superficie cortical (CTh, del inglés *cortical thickness*) de las imágenes estructurales ponderadas en T1. Brevemente, los procedimientos ejecutados en FreeSurfer incluyen: corrección del movimiento, eliminación ósea craneal, segmentación de la sustancia blanca subcortical y estructuras volumétricas de

la sustancia gris, teseleado de los bordes, y definición de la transición entre los tipos de tejidos. El grosor cortical se calculó como la menor distancia entre el límite sustancia gris / sustancia blanca y el límite sustancia gris / líquido cefalorraquídeo. Los procedimientos automatizados FreeSurfer también incluyen parcelación del córtex cerebral en unidades basadas en estructura de giros y surcos¹²². Los mapas producidos no se restringen a la resolución de los datos originales y por tanto, son capaces de detectar diferencias submilimétricas entre grupos.

Análisis estadístico

El análisis de grupos de los datos demográficos y cognitivos se realizó utilizando *Predictive Analysis Software* (PASW versión 17, IBM). Se utilizó el test *t* de Student con dos colas o el análisis de la varianza para las variables continuas y el test χ^2 para las variables categóricas. También se realizó análisis de correlación entre las variables continuas.

Con respecto a los datos de imagen, después de la inspección visual de los mapas corticales y la segmentación subcortical, los mapas esféricos reconstruidos se utilizaron para investigar patrones en los grupos. Se registraron los datos esféricos basados en el vértice en una plantilla estándar y fueron suavizados utilizando un ancho total a la mitad del máximo de 15 mm. El análisis de los mapas de grosor cortical de todo el cerebro se realizó utilizando la herramienta Qdec del FreeSurfer. Como estudio preliminar realizamos una comparación mediante test *t* entre grupos. Se introdujo la edad y el sexo como covariables en la comparación. Posteriormente examinamos el efecto de la edad en los mapas de grosor cortical separadamente para cada grupo. Para este propósito, se hizo una regresión de los mapas de grosor cortical de todo el cerebro contra la edad de los sujetos en dos análisis separados para controles y para portadores de la mutación. Este análisis por separado se realizó para discriminar los efectos de la mutación de aquellos provocados por la propia edad. Además, se realizó con todos los sujetos un análisis complementario de la interferencia entre los efectos edad x grupo. El análisis de interferencia se diseñó para detectar áreas en las que la curva de correlación edad-grosor cortical difiriera entre grupos. Finalmente, exploramos las correlaciones entre el grosor cortical de todo el cerebro y los test cognitivos que previamente se habían mostrado diferentes significativamente entre portadores y no portadores de la mutación en *GRN* (TMT-A, TMT-B y Test de Denominación de Boston).

En todos los análisis, los mapas resultantes fueron corregidos para errores “family-wise” (FWE) utilizando simulaciones Monte Carlo con 10.000 repeticiones y solamente se consideraron los clústeres con un límite corregido de $p < 0.05$. Finalmente, obtuvimos el grosor cortical medio dentro de las parcelaciones basadas en atlas¹²², y examinamos las correlaciones entre la edad y estas medidas en cada grupo, utilizando la correlación de Pearson en el software PASW. Adicionalmente, modelamos un análisis multivariante de los efectos de la interacción edad por grupo.

RESULTADOS

Los portadores tenían una edad media de 53.77 años (DE, 11.50; rango 24-71 años) y los no portadores 52.77 años (DE, 13.78; rango, 24-71). El índice hombre/mujer fue 6/7 en ambos grupos. No había diferencias significativas en la edad o el sexo entre grupos.

Comparación de grosor cortical entre grupos

No encontramos diferencias significativas entre portadores y controles en los mapas de grosor cortical de todo el cerebro después de corregir por comparaciones múltiples. Cuando examinamos el efecto de la edad dentro del grupo de portadores, el grosor cortical estaba correlacionado negativamente con la edad en varias regiones cerebrales (Figura 1A). La curva de correlación se calculó utilizando el grosor cortical medio dentro de los clústeres estadísticamente significativos (r de Pearson = -0.95; $p < 0.001$; diagrama en Figura 1A). El análisis de la relación entre la edad y el grosor cortical dentro del grupo de no portadores reveló un clúster de adelgazamiento cortical relacionado con la edad en el hemisferio derecho, abarcando parte del giro precentral y postcentral (Figura 1B). La curva de correlación se calculó utilizando el grosor cortical medio dentro de este clúster (r de Pearson = -0.86; $p < 0.001$; diagrama en figura 1B).

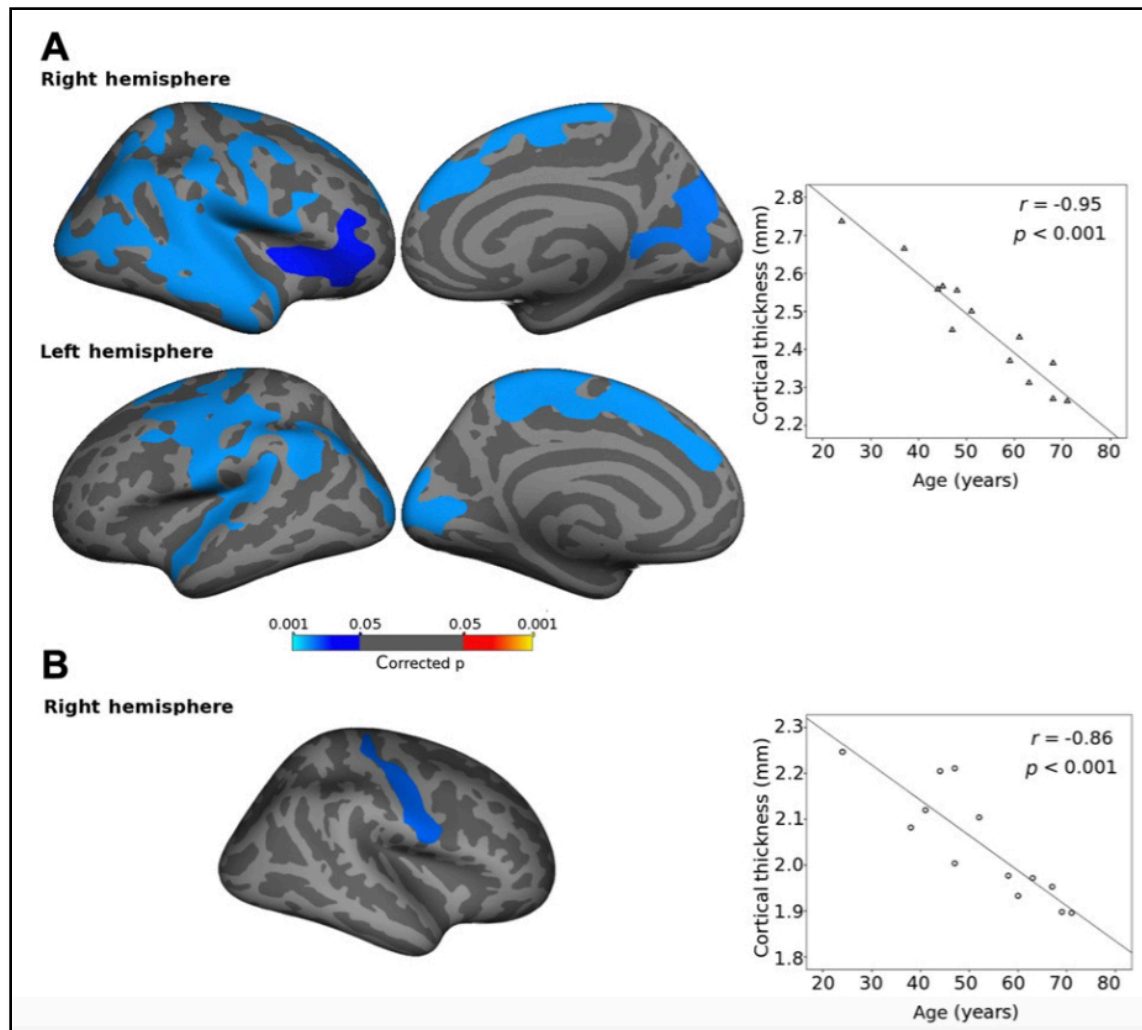


Figura 1. Análisis de correlación entre el grosor cortical y la edad. Se muestran los resultados para el grupo de portadores de la mutación en GRN (A) y el grupo de no portadores (B). Únicamente se muestran los clústeres con un nivel de significación corregido de $p < 0.05$.

Para analizar con mayor profundidad las diferencias en la curva de correlación entre grupos realizamos un análisis de interacción edad x grupo. Encontramos un clúster de diferencias significativas en las curvas de correlación entre grupos (Figura 2). Este clúster incluía áreas dentro del córtex temporal superior derecho y córtex temporal medio. En este región, aunque en el grupo de no portadores, el grosor cortical permanecía estable en función de la edad (r de Perason = 0.012; $p = 0.97$), había una correlación negativa significativa para el grupo de portadores ($r = -0.911$; $p < 0.001$).

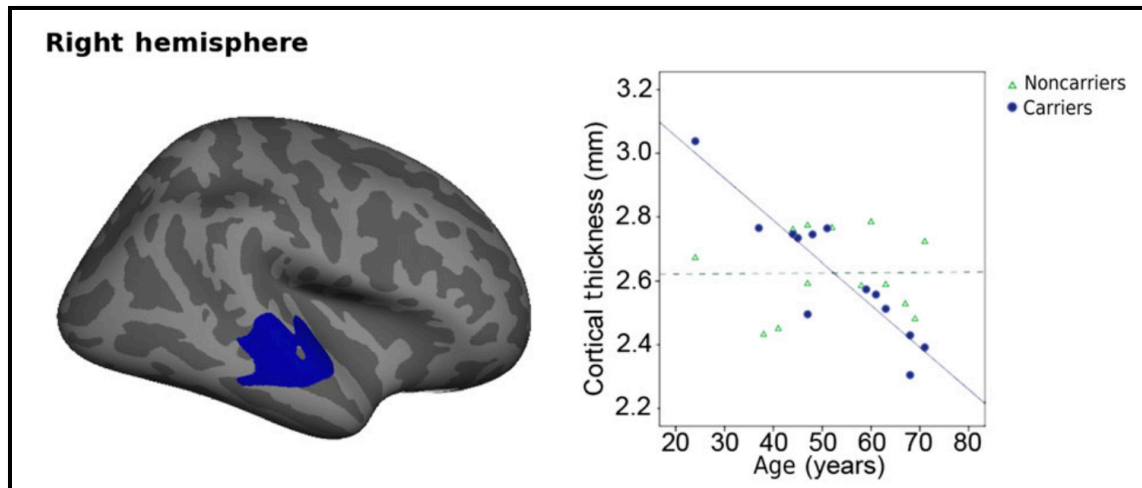


Figura 2. Análisis de la interacción edad x grupo en el grosor cortical. La región mostrada en azul tiene un valor de p corregido de 0.03. Los valores de CTh en el panel de la derecha son la media de CTh para cada sujeto dentro del clúster significativo en el mapa. Las líneas discontinuas azul y verde discontinuas representan las correlaciones entre CTh y edad, de forma separada para cada grupo.

Para confirmar los hallazgos anteriores, analizamos las correlaciones entre la edad y el grosor cortical medio en los giros temporales superior y medio y en los aspectos posteriores del surco temporal superior utilizando parcelaciones basadas en atlas. En el hemisferio derecho encontramos una correlación negativa significativa con la edad en todas estas regiones en el grupo de portadores, pero no en los no portadores. Por el contrario, en el hemisferio izquierdo, solamente el grosor cortical de la parcelación del aspecto posterior del surco temporal superior en el grupo de portadores tuvo una correlación negativa significativa con la edad (Figura 3). Sin embargo, el análisis de interacción edad x grupo en los valores de grosor cortical medios por regiones de interés no fue significativo para ninguna de las regiones analizadas ($p = 0.72$ para el aspecto posterior del surco temporal superior izquierdo; $p = 0.33$ para el aspecto posterior del surco temporal superior derecho; $p = 0.58$ para giro temporal superior derecho; $p = 0.41$ para giro temporal medio derecho).

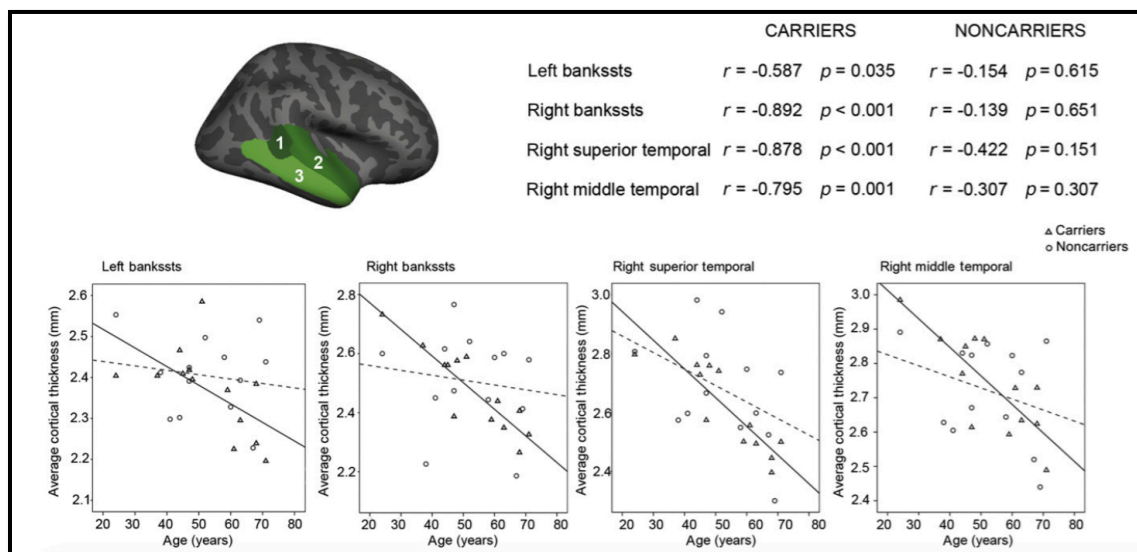


Figura 3. Análisis del grosor cortical basado en regiones seleccionadas a priori. Análisis de CTh dentro de las parcelaciones basadas en atlas del aspecto posterior del surco temporal superior (1), giro temporal superior (2) y giro temporal medio (3).

Aunque los grupos estaban emparejados por edad y sexo, realizamos una correlación por edad y análisis de interacción edad x grupo considerando el sexo como covariable. Los resultados no cambiaron, indicando que no existía una interacción por sexo en el adelgazamiento cortical relacionado con la edad.

Correlación con las variables neuropsicológicas

El grosor cortical estaba correlacionado negativamente con las puntuaciones en TMT-A (medido como segundos en completar la tarea; puntuaciones más bajas indicando un mejor rendimiento) en varias regiones corticales en el grupo portador de la mutación, tanto en hemisferio izquierdo como derecho ($p < 0.05$, corregido FWE). Las características de los clústeres y sus localizaciones se resumen en la Figura 4A. Después de ajustar por edad, la correlación continuaba siendo estadísticamente significativa solamente para un clúster en el lóbulo frontal derecho (giro precentral, frontal caudal medio y parte opercular).

El grosor cortical también se correlacionó negativamente con las puntuaciones en TMT-B en varias regiones del córtex en el grupo de portadores de la mutación, en ambos hemisferios ($p < 0.05$, corregido FWE). De la misma forma, las características y localización de los clústeres se resumen en la Figura 4B. Después de ajustar por edad, esta correlación seguía siendo significativa por un clúster en el lóbulo temporal

derecho (giro temporal superior, medio e inferior y aspecto posterior del surco temporal superior).

Por último, el grosor cortical estaba correlacionado positivamente con las puntuaciones en el Test de Denominación de Boston (número total de ítems nombrados correctamente) en el grupo de portadores de la mutación en *GRN*. Los clústeres para los que el valor de p excedía un nivel de significación corregido de 0.05 se resumen en la Figura 4C. Tras ajustar por la edad, sin embargo, no existían áreas en las que dicha correlación fuera significativa.

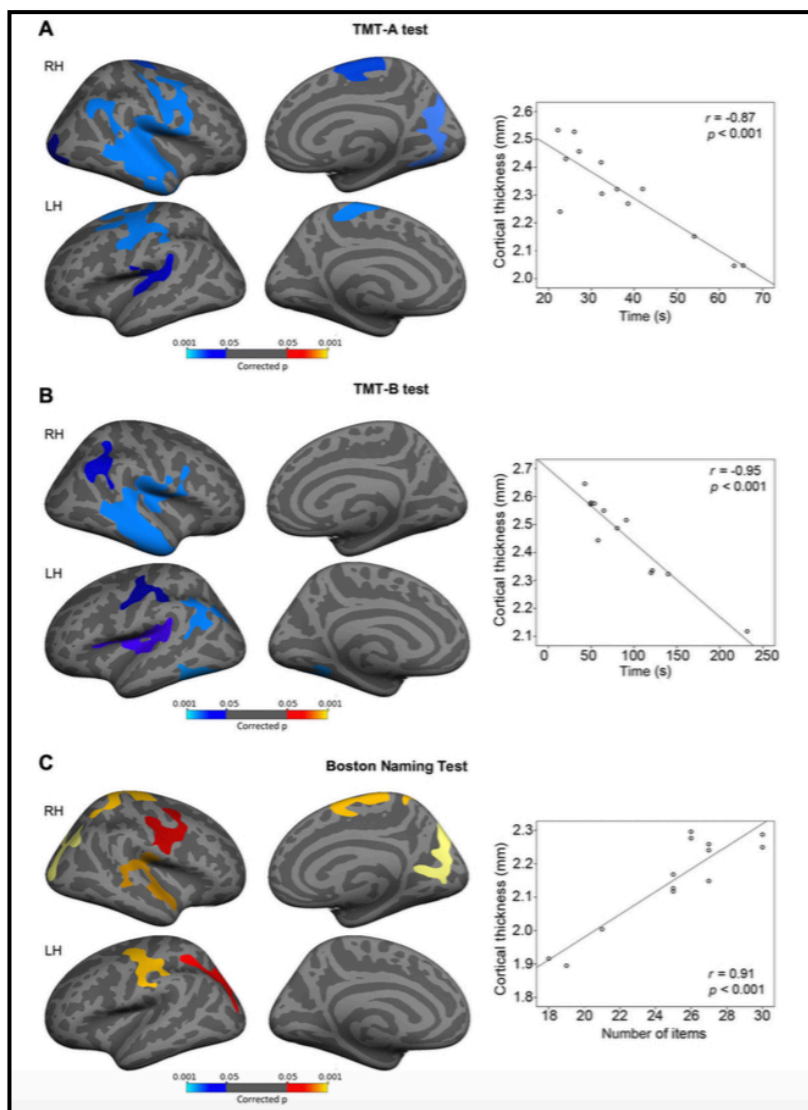


Figura 4. Análisis de correlación entre el grosor cortical y las puntuaciones en test neuropsicológicos para los portadores de mutación en *GRN*. Los clústeres en colores fríos representan áreas con correlaciones negativas, y los clústeres con colores calientes representan áreas con correlación positiva. Los diagramas en la derecha representan CTh media dentro de las regiones significativas para cada mapa de la izquierda, y su correlación con la medida obtenida para cada uno de los test. LH: hemisferio izquierdo; RH: hemisferio derecho.

DISCUSIÓN ACTUALIZADA

En este artículo estudiamos la morfología cerebral de sujetos presintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* mediante el análisis de grosor cortical en comparación con un grupo de sujetos controles. Es conocido que los sujetos en fases sintomáticas presentan un patrón de atrofia cerebral asimétrico, afectando a la corteza frontal, temporal posterior y parietal inferior^{74,79,80,81}, pero no se conoce cuándo comienzan dichos cambios o si es posible detectar cambios estructurales en sujetos presintomáticos. Nosotros encontramos que, a pesar de no haber diferencias en la comparación global del grosor cortical entre sujetos presintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* y sujetos control, sí existía un adelgazamiento cortical en sujetos portadores asociado a la edad y diferente al observado en controles, en regiones temporales laterales, implicando los giros temporales superior y medio derechos y ambos aspectos posteriores de los giros temporales superiores. Además, observamos en los sujetos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* una correlación entre el rendimiento en las pruebas neuropsicológicas *Trail Making Test* partes A y B y Test de Denominación de Boston, y el grosor cortical en diversas regiones, de forma que un peor rendimiento en las pruebas se asociaba con un menor grosor cortical, preferentemente en regiones de lóbulos frontales y temporales. Estos hallazgos sugieren un efecto precoz y específico de la enfermedad en áreas del lóbulo temporal lateral, que pueden observarse años antes del desarrollo clínico de la enfermedad. Previamente a este artículo, estudios en pequeñas series no habían encontrado diferencias entre sujetos sanos control y sujetos presintomáticos portadores de mutaciones en *GRN* en neuroimagen estructural con técnicas de *voxel-based morphometry*^{123,117}, aunque sí se había encontrado diferencias con controles en medidas de integridad de sustancia blanca mediante *diffusion tensor imaging* (DTI) en el fascículo uncinado y el fascículo frontooccipital inferior izquierdos¹²³, o diferencias en la conectividad de la *salience network* mediante técnicas de resonancia magnética funcional¹¹⁷. Con posterioridad a este trabajo, se han seguido publicado estudios comparativos en sujetos presintomáticos portadores de mutaciones en *GRN* frente a sujetos control, que muestran alteraciones en neuroimagen previas al inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad, como hipometabolismo frontal derecho en tomografía de emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa (FDG-PET)¹²⁴, alteraciones en la conectividad estructural mediante DTI^{125,126}, o en la conectividad funcional en córtex frontal y parietal mediante RM funcional^{125,127,128}. Todos estos

estudios, aunque con resultados y modalidades de neuroimagen algo diferentes, muestran que los sujetos portadores de mutaciones en *GRN* presentan alteraciones en el metabolismo o en la conectividad cerebral en áreas fronto-temporo-parietales, que pueden ser detectadas años antes del inicio sintomático. Aportando consistencia a nuestros resultados han aparecido dos nuevos estudios en los que se apunta a la atrofia del lóbulo temporal lateral como un posible marcador inicial de la enfermedad. En el estudio colaborativo de la iniciativa GENFI referido anteriormente, encuentran que las diferencias en neuroimagen estructural entre portadores de mutaciones en *GRN* y no portadores pueden ser detectadas en la ínsula 15 años antes de la edad esperada de inicio; y en regiones temporales y parietales 10 años antes de la edad esperada de inicio¹²¹. Por último Caroppo et al., encontraron también hipometabolismo temporal y disminución del grosor cortical en el lóbulo temporal en un seguimiento longitudinal de portadores presintomáticos de *GRN*¹²⁹.

Los estudios en sujetos presintomáticos con mutaciones causantes de enfermedades neurodegenerativas son esenciales para identificar biomarcadores (analíticos, neuropsicológicos o de neuroimagen) que sean indicativos del inicio de la enfermedad y para trazar su progresión, pre-requisitos para el diseño de terapias modificadoras de la enfermedad.

ESTUDIO 5

RESUMEN

La variante p.A152T en MAPT podría modular la neuropatología de la degeneración lobar frontotemporal asociada mutaciones en el gen de la progranulina (GRN)

Objetivo: Investigar la influencia de la variante p.A152T en *MAPT* en el fenotipo clínico y neuropatológico de familias vascas portadoras de la mutación c.709-1G>A en *GRN*.

Métodos: Se compararon el fenotipo clínico (n=35), rendimiento neuropsicológico (n=18) y niveles de progranulina plasmáticos (n=23) entre el grupo de pacientes con demencia frontotemporal portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* y la variante p.A152T en *MAPT* (*GRN*+/*A152T*+) y el grupo de pacientes portadores únicamente de la mutación en *GRN* (*GRN*+/*A152T*-). También analizamos el haplotipo de las dos familias más extensas para estimar la datación de la mutación. Se estudiaron siete autopsias cerebrales disponibles.

Resultados: Ambos grupos presentaron hallazgos clínicos y neuropsicológicos similares. El grupo *GRN*+/*A152T*+ presentó una tendencia no significativa a tener niveles plasmáticos de progranulina más bajos. Las siete autopsias cerebrales disponibles (6 *GRN*+/*A152T*+ y 1 *GRN*+/*A152T*-) presentaban hallazgos característicos de DLFT-TDP tipo A y todas tenían también inclusiones patológicas tau en grado leve a moderado, no acompañadas de patología β -amiloide, excepto en dos casos en que coexistía patología de enfermedad de Alzheimer. La datación de la mutación se puede estimar con un 95% de probabilidad en 0 a 49 generaciones.

Conclusiones: La asociación de la variante p.A152T en *MAPT* en portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* parece no tener influencia en el fenotipo clínico o neuropsicológico, pero podría influir en la neuropatología, confiriendo a estos pacientes una mayor predisposición a presentar patología tau cerebral asociada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Todos los pacientes del estudio pertenecen a 18 familias, todas de origen vasco, que comparten una mutación en *GRN*. Para analizar la prevalencia de la variante p.A152T también incluimos 507 sujetos control no relacionados, 57 pacientes con enfermedad de Parkinson con la mutación R1441 o G2019S en el gen *leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* y 20 pacientes con enfermedad de Steinert. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Donostia. Se obtuvo consentimiento informado por escrito de todos los participantes.

Evaluación clínica

Se incluyeron 35 pacientes de 18 familias de DFT-*GRN* en el análisis. Los diagnósticos clínicos fueron validados en una reunión de neurólogos y neuropsicólogos expertos de acuerdo con criterios clínicos. Incluimos el tiempo desde el inicio hasta el desarrollo de síntomas motores en el análisis como variable. Para 21 participantes de los que disponíamos de imágenes de resonancia magnética cerebral estructural, clasificamos a cada participantes en función de la presencia o ausencia de asimetría basados en la inspección visual de las imágenes.

Evaluación neuropsicológica

Dieciocho pacientes disponían de una evaluación neuropsicológica estandarizada dentro del primer año después del inicio de los síntomas. Se incluyeron 18 individuos en este análisis. La evaluación neuropsicológica consistió en una batería de test cognitivos. El estado cognitivo general fue evaluado utilizando el *Mini-Mental State Examination* (MMSE). La memoria episódica verbal y la copia de dibujos se evaluaron utilizando los subtests de lista de palabras y praxis constructivas del *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD). También incluimos el *Trail-Making Test* Partes A y B (TMT-A y B) y el protocolo neuropsicológico GERMCIIDE que incluye span de dígitos directo e inverso, fluencia verbal semántica (animales) y fonética, comprensión y repetición verbal, razonamiento y test de praxis unilaterales y bilaterales.

Niveles de progranulina

Comparamos los niveles plasmáticos de progranulina que estaban disponibles para 23 pacientes, 14 *GRN+/A152T-* y 9 *GRN+/A152T+*. Las muestra de plasma fueron diluidas a 1:100 en el buffer de dilución provisto y los niveles de PGRN se midieron en un set duplicado utilizando el ensayo comercial ELISA (Progranulin [human] ELISA kit, AdipoGen, Inc, South Korea; ref AG-45A-0018YEK-KI01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PGRN recombinante humana provista con el kit ELISA se utilizó como estándar.

Estudios genéticos

Se utilizaron procedimientos estándar para extraer el ADN de sangre total. El genotipado de *MAPT* SNP rs143624519 se realizó con un ensayo de discriminación alélica TaqMan con sondas incluidas en el inventario (Applied Biosystems) y el sistema PCR LightCycler96. Las llamadas del genotipado se realizaron utilizando el software LightCycler96 SW1.1 (Roche).

Para analizar los haplotipos y estimar la edad de la mutación, decidimos basar el análisis en las dos familias más extensas e informativas, familia 1 y 2, para las que disponíamos muestras de ADN de 21 y 26 individuos respectivamente. Para examinar el haplotipo alrededor de la mutación c.709-1G>A en *GRN* y *MAPT* SNP rs143624519 escribimos seis marcadores de repeticiones cortas en tándem (*short tandem repeat*, STR) abarcando una región de 4.46 Mb en el cromosoma 17q21. Todos los marcadores (D17S930, D17S1861, D17S950, D17S934, D17S920, and D17S1868) fueron amplificados con un *primer* marcado con fluorescencia. Los fragmentos PCR fueron analizados en un analizador de ADN automatizado ABI 3100 y los alelos fueron puntuados utilizando el software GeneMapper (Applied Biosystems). Los haplotipos fueron resueltos con PHASE 2.1. La edad de la mutación c.709-1G>A en *GRN* fue estimada de la ecuación 28 de Walsh et al.¹³⁰, considerando una tasa general de mutación STR de $m=0.001$, junto con una tasa estimada de recombinación entre los marcadores extremo del haplotipo de $r=0.022$ (de Kong et al.¹³¹)

Análisis neuropatológico

Los estudios neuropatológicos se realizaron en el Hospital Universitario Donostia, sede del Banco de Tejidos Neurológicos del Biobanco Vasco de

Investigación (OEHUN), de acuerdo a protocolos estandarizados. La mitad derecha del cerebro se cortó en fresco y se almacenó congelada a -80°C . La mitad izquierda del cerebro se fijó en formaldehído al 10% durante 3 a 4 semanas. La evaluación histológica se realizó en secciones de $5\ \mu\text{m}$ de espesor en bloques de tejido incrustados en parafina y fijados en formalina de tejido de áreas del cerebro izquierdo: córtex frontal, temporal, parietal y occipital, córtex motor, giro cingulado anterior y posterior, ganglios basales (incluyendo núcleos estriado y lenticular), núcleo basal de Meynert, tálamo (núcleos anterior y medio, incluyendo núcleo subtalámico), núcleo pulvinar, amígdala, hipocampo anterior y posterior, con el giro parahipocampal, mesencéfalo (con sustancia negra rostral y caudal), protuberancia con locus coeruleus, bulbo, vermis cerebeloso, núcleo dentado del cerebelo y bulbo olfatorio.

Las secciones de cada bloque de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina y, adicionalmente, se utilizó una tinción de azul rápido Luxol en algunos bloques. La inmunohistoquímica automatizada se realizó utilizando anticuerpos primarios en un sistema de tinción Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, USA). El procedimiento de tinción Ventana incluye un pretratamiento con acondicionador celular 1 (pH 8) o 2 (pH 6), y ácido fórmico, dependiendo del anticuerpo, seguido de incubación con el correspondiente anticuerpo. Esta incubación fue seguida de tratamiento con ultraView Universal DAB. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti- β -amiloide (dilución 1:50, monoclonal, clon 12F4, Covance), anti-PHF tau (dilución 1/2000, monoclonal, clon AT8, Innogenetics), anti- α -sinucleína (dilución 1:4000, monoclonal, clon LB509, Covance), anti-TARDBP (dilución 1:1000, monoclonal, clon 2E2-D3, Abnova), anti-ubiquitina (dilución 1:300, policlonal, Dako), anti-PrP (dilución 1:100, monoclonal, clon 3F4, Millipore), anti-tau (isoforma de 4 repeticiones RD4) (dilución 1:80, monoclonal, clon 1E1/A6, Millipore), anti-tau (isoforma de 3 repeticiones RD3) (dilución 1:300, monoclonal, clon 8E6/C11, Millipore), neurofilamentos (prediluido, monoclonal, clon 2F11, Roche), y anti- α B-cristalina (dilución 1:500, policlonal, ABN185, Millipore).

Análisis estadístico

Para las comparaciones entre grupos, las variables categóricas descritas como frecuencias absolutas fueron comparadas mediante el test χ^2 o el test exacto de Fisher y las variables continuas fueron comparadas con el test U de Mann-Whitney. El

análisis estadístico se realizó utilizando IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 17.0.0.

RESULTADOS

Tras el hallazgo de que un elevado número de individuos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* también eran portadores de la variante p.A152T en *MAPT*, realizamos una búsqueda de dicha variante en otros grupos de origen vasco incluyendo controles sanos y en otras enfermedades neurológicas de origen genético que son raras en otras poblaciones, pero con una mayor prevalencia relativa en población vasca, incluyendo la distrofia miotónica tipo 1 (enfermedad de Steinert) y enfermedad de Parkinson relacionada con mutaciones en *LRRK2*. Encontramos siete portadores (1.4%) en controles no relacionados (n = 507), un portador de 57 pacientes con EP con mutaciones en *LRRK2*, y ningún portador de 20 pacientes con enfermedad de Steinert. También ampliamos el análisis a todos los individuos de las familias con la mutación c.709-1G>A en *GRN* que habían participado en estudios previos (n = 102) y encontramos que 37 de 60 portadores de la mutación en *GRN* eran también portadores de la variante p.A152T en *MAPT* (61.7% en general, 60% de portadores afectados y 64% de portadores presintomáticos) y 5 de 42 familiares no portadores de la mutación en *GRN* (11.9%) también tenían la variante p.A152T (100% asintomáticos) (Tabla 1). Los análisis de desequilibrio de ligamiento revelaron que ambas variantes genéticas, localizadas en el cromosoma 17 estaban en desequilibrio parcial de ligamiento ($D' = 0.78$; $r^2 = 0.46$).

Tabla 1. Distribución de las frecuencias de c.709-1G>A en *GRN* y p.A152T en *MAPT*

	Sintomáticos (n)	Pre/Asintomáticos (n)	Total (n)
<i>GRN</i> +/ <i>A152T</i> +	21	16	37
<i>GRN</i> +/ <i>A152T</i> -	14	9	23
<i>GRN</i> -/ <i>A152T</i> +	0	5	5
<i>GRN</i> -/ <i>A152T</i> -	0	37	37
Total	35	67	102

GRN+: portador de la mutación c.709-1G>A en *GRN*; *GRN*-: portador de la mutación c.709-1G>A en *GRN*; *A152T*+: portador de la variante p.A152T en *MAPT*; *A152T*-: no portador de la variante p.A152T en *MAPT*.

Origen de la mutación

Disponíamos de datos de haplotipo STR para 5 sujetos *GRN*⁺ y 16 *GRN*⁻ en la familia 1 y para 12 sujetos *GRN*⁺ y 14 *GRN*⁻ en la familia 2. La mutación c.709-1G>A en *GRN* iba en el mismo haplotipo en ambas familias, abarcando los alelos 106, 91, 128, 185, A, 98 y 185 en los siguientes *loci*: D17S930, D17S1861, D17S934, D17S950, rs14362519, D17S920 y D17S1868. Destacar que el nucleótido A en rs143624519 corresponde a la sustitución T en *MAPT* A152T. Este haplotipo no fue encontrado en una muestra de 18 cromosomas control (todos los cuales portaban diferentes haplotipos) o en 29 cromosomas no portadores de la mutación de las familias afectas. Por tanto, es más probable que estas dos familias comparten la mutación c.709-1G>A en *GRN* a través de un ancestro común a que derive de dos eventos mutacionales independientes. Usando la ecuación 28 de Walsh se estima con un 95% de probabilidad que la mutación apareció entre 0 y 49 generaciones atrás.

En la familia 2, encontramos tres hermanos *GRN*⁺/A152T⁻. Sin embargo sus haplotipos STR eran consistentes con un evento de recombinación único entre D17S950 y A152T en la transmisión de la mutación desde el abuelo materno a su madre como se puede reconstruir de otros descendientes de su abuelo materno.

Fenotipo clínico

Comparamos el fenotipo clínico de los pacientes con DFT portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* (*GRN*⁺/A152T⁻) (n = 14) frente a aquellos portadores tanto de la mutación en *GRN* como de la variante en p.A152T en *MAPT* (*GRN*⁺/A152T⁺) (n = 21). No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en el diagnóstico clínico inicial. Aunque la diferencia no fue significativa, se observó un diagnóstico de SCB a lo largo del curso de la enfermedad más frecuente para el grupo *GRN*⁺/A152T⁺. La edad de inicio de los síntomas no estaba asociada con la presencia de la variante p.A152T en *MAPT* en los portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*, con una edad media de inicio de 60.95 ± 7.14 años en los portadores de A152T y de 61.36 ± 9.22 años en los no portadores de A152T (*p* = 0.622). El tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el desarrollo de síntomas motores también fue similar en ambos grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las variables demográficas y clínicas entre grupos.

	<i>GRN+/A152T+</i>	<i>GRN+/A152T-</i>	<i>p</i>
Sexo (Hombres/Mujeres)	6/15	7/7	0.288
Edad de inicio (años)	60.95 ± 7.14	61.36 ± 9.22	0.622
Diagnóstico inicial	DFTvc (10)	DFTvc (9)	0.977
	APNF (5)	APNF (2)	
	EA (3)	EA (2)	
	SCB (1)	SCB (0)	
	Otros (2)	Otros (1)	
Diagnóstico de SCB durante la enfermedad (sí/no)	12/9	5/9	0.305
Asimetría RM cerebral (sí/no)	6/5	7/3	0.659
Tiempo al inicio de síntomas motores (años)	3.06 ± 1.25	3.1 ± 1.66	0.843

APNF: afasia progresiva no fluente; DFTvc: variante conductual de la demencia frontotemporal; EA: enfermedad de Alzheimer; SCB: síndrome corticobasal.

Fenotipo neuropsicológico

Comparando el rendimiento neuropsicológico inicial en los pacientes portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* (*GRN+/A152T-*) (n=9) con aquellos portadores de la mutación en *GRN* y la variante en *MAPT* (*GRN+/A152T+*) (n=8), no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las variables estudiadas. Encontramos una tendencia no significativa en el grupo *GRN+/A152T+* hacia un peor rendimiento, particularmente en test frontales como el span de dígitos inverso, TMT-A, TMT-B y las fluencias verbales fonética y semántica (Tabla 3).

Doce de estos pacientes fueron evaluados en una segunda exploración neuropsicológica un año después de la exploración inicial. Comparando los cambios en la puntuación del test MMSE en los pacientes portadores de la mutación en *GRN* (*GRN+/A152T-*) frente a los portadores de ambas variantes (*GRN+/A152T+*), encontramos que el grupo *GRN+/A152T+* presentaba una tendencia no significativa a un mayor declive en la puntuación del MMSE en dicho control evolutivo al año.

Tabla 3. Comparación del rendimiento neuropsicológico entre grupos.

	<i>GRN+/A152T+</i>	<i>GRN+/A152T-</i>	<i>p</i>
<i>MMSE</i>	23.63 ± 4.37	24.50 ± 3.95	0.66
<i>Span dígitos directo</i>	4.75 ± 0.71	4.6 ± 0.70	0.66
<i>Span dígitos inverso</i>	2.38 ± 1.30	3.10 ± 0.74	0.15
<i>TMT-A</i>	100.8 ± 50.63	76.83 ± 26.28	0.34
<i>TMT-B</i>	200 ± 36.74	180.17 ± 73.88	0.60
<i>Fluencia verbal semántica</i>	9.88 ± 4.02	11.30 ± 4.55	0.50
<i>Fluencia verbal fonética</i>	3.67 ± 3.08	7.33 ± 6.25	0.23
<i>Razonamiento</i>	5.13 ± 3.48	4.30 ± 2.11	0.54
<i>Comprensión verbal</i>	5.63 ± 0.74	5.89 ± 0.33	0.35
<i>Repetición</i>	9.88 ± 0.35	9.89 ± 0.33	0.93
<i>Praxis unilaterales</i>	8.63 ± 3.16	9.78 ± 0.44	0.34
<i>Praxis bilaterales</i>	6.13 ± 2.29	6.44 ± 1.74	0.75
<i>CERAD Lista palabras 1</i>	2.25 ± 1.39	2.70 ± 0.95	0.43
<i>CERAD Lista palabras 2</i>	3.63 ± 1.51	4.10 ± 1.10	0.45
<i>CERAD Lista palabras 3</i>	4.75 ± 1.98	5.20 ± 2.10	0.65
<i>CERAD Recuerdo</i>	3.2 ± 1.55	2.37 ± 1.99	0.34
<i>CERAD Reconocimiento</i>	17.50 ± 1.93	16.30 ± 3.56	0.38
<i>CERAD Praxis constructivas</i>	9.13 ± 3.23	9.30 ± 1.83	0.89
<i>Cambio puntuación MMSE al año</i>	-5.17 ± 3.76	-3.67 ± 2.81	0.45

CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; MMSE: Mini-Mental State Examination; TMT: Trail Making Test.

Niveles de progranulina

El grupo portador de ambas variantes (*GRN+/A152T+*) mostró una tendencia no significativa a presentar niveles plasmáticos de progranulina más bajos (media: 54 ± 19.1 ng/ml) que aquellos portadores exclusivamente de la mutación en *GRN* (media: 72.5 ± 31.4 ng/ml) (test U de Mann-Whitney: $p = 0.201$). De forma interesante, considerando la distribución de los niveles plasmáticos de progranulina, observamos que 5 de 14 pacientes (35.7%) en el grupo *GRN+/A152T+* tenían niveles de progranulina por debajo de 45 ng/ml y 11 de 14 (78.6%) por debajo de 70 ng/ml, mientras que dichos porcentajes fueron 0% y 55.5% respectivamente en el grupo *GRN+/A152T-*.

Fenotipo neuropatológico

Realizamos estudio neuropatológico en siete pacientes, seis del grupo *GRN+/A152T+* y uno del grupo *GRN+/A152T-*, lo que dificultó la realización de comparaciones formales. Todos los cerebros mostraron los hallazgos histopatológicos característicos de la degeneración lobar frontotemporal (DLFT) con inclusiones positivas para ubiquitina, negativas para tau y positivas para TDP-43 consistentes con el subtipo de DLFT tipo A. Dos de los pacientes portadores de la mutación en *GRN* y la variante en *MAPT* tenían además patología de enfermedad de Alzheimer.

Tras el hallazgo de la coexistencia de la variante p.A152T en *MAPT* en estas familias, una neuropatóloga (M.C.C.) realizó de forma ciega al status genético de los pacientes un estudio semi-cuantitativo de la patología tau en estos cerebros. Los resultados se resumen en la Tabla 4. Todas las autopsias mostraron patología tau en cantidad leve a moderada. Las inclusiones tau incluyeron hilillos neuropílicos, ovillos neurofibrilares, pre-ovillos e inclusiones en astrocitos, siendo los hilillos neuropílicos y los pre-ovillos neurofibrilares (*“pretangles”*) las inclusiones más frecuentes. La amígdala, el córtex entorrinal y transentorrinal y el núcleo basal de Meynert estaban afectados de forma consistente por inclusiones tau-positivas. El estriado estaba habitualmente más afectado que el globo pálido, y en el neocórtex la patología tau era más prominente en el lóbulo temporal seguido del córtex frontal y el lóbulo occipital. En la mayoría de los casos, excepto en los dos pacientes que recibieron un diagnóstico patológico de enfermedad de Alzheimer, dichas inclusiones tau-positivas no estaban acompañadas por patología β -amiloide. Un paciente del grupo *GRN+/A152T+* recibió un diagnóstico de tauopatía no clasificable porque presentaba,

además de la patología TDP-43, una carga de tau inusualmente más difusa y severa, con inmunoreactividad tau en astrocitos y un patrón que no encuadraba de forma adecuada en ninguna de las tauopatías definidas.

Fenotipo de los portadores p.A152T y GRN-

En el momento del estudio, ninguno de los cuatro portadores de la variante p.A152T en *MAPT* y negativos para la mutación c.709-1G>A en *GRN* presentaban síntomas de enfermedad neurodegenerativa.

Tabla 4. Análisis semi-cuantitativo de la patología en autopsias individuales.

	Patología tau	Córtex frontal	Córtex temporal	Córtex occipital	Estriado	Núcleo lenticular	Tálamo	Núcleo Meynert	Amígdala	Córtex entorrinal	Sustancia negra	Locus coeruleus	Bulbo olfatorio
DLFT-TDP tipo A (57 años, GRN+/p.A152T-)	HN	++	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
	PT	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
	ONF	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	PN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DLTF-TDP tipo A (64 años, GRN+/p.A152T+)	HN	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	PT	+	+	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-
	ONF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DLFT-TDP tipo A (70 años, GRN+/p.A152T+)	HN	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	PT	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
	ONF	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	PN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FTLD-TDP tipo A (76 years, GRN+/p.A152T+)	HN	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	PT	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	ONF	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	PN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DLFT-TDP tipo A + tauopatía no clasificable (75 años, GRN+/p.A152T+)	HN	+	+++	+	+	++	+	+++	+++	+++	++	++	+
	PT	+	+++	-	++	++	-	+++	+++	+++	-	++	+
	ONF	-	+++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	-
	PN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AST	+	++	+	+	-	-	-	++	+	-	-	-
DLFT-TDP tipo A + enfermedad de Alzheimer (71 años, GRN+/p.A152T+)	HN	+	++	-	+	-	-	+	-	+	+	++	-
	PT	-	+	-	+	-	+	+	++	+	-	+++	-
	ONF	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	PN	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DLFT-TDP tipo A + enfermedad de Alzheimer (76 años, GRN+/p.A152T+)	HN	+	+++	+	+	+	+	+	+++	+++	+	++	+
	PT	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	ONF	+	++	-	-	-	+	++	++	+++	-	+	-
	PN	-	+	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-
	AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

HN: hilillos neuropílicos; PT: *pretangles*; ONFs: ovillos neurofibrilares; PN: placas neuríticas; AST: inclusiones astrocitarias.

DISCUSIÓN ACTUALIZADA

En el año 2014 encontramos, de forma inesperada, que en las familias vascas con la mutación c.709-1G>A en *GRN* muchos de los sujetos asociaban también la variante p.A152T en *MAPT*. Estas dos variantes genéticas cosegregan parcialmente en estas familias. Este es un hallazgo excepcional, pues la variante p.A152T aparece en una frecuencia muy baja en grupos controles (0.25-0.71%), y algo mayor en pacientes con DFT (0.72-1.42%) y enfermedad de Alzheimer (0.56-1.02), para las que se ha descrito como un factor de riesgo⁴⁶. En este artículo estudiamos la coexistencia de la variante p.A152T de *MAPT* en sujetos de estas familias con la mutación c.709-1G>A en *GRN* y su posible influencia en el fenotipo. Nuestro estudio no puede concluir que la variante p.A152T en *MAPT* ejerza algún efecto en el fenotipo clínico, neuropsicológico o neuropatológico en estos pacientes con DFT y portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN*. Desde el punto de vista neuropatológico no se pudo hacer una comparación formal pues de las siete autopsias estudiadas, seis pertenecían a sujetos portadores de ambas variantes genéticas (*GRN*+/*p.A152T*+). Encontramos que todos tenían los hallazgos histopatológicos típicos de DLFT-TDP tipo A, pero además todos tenían una cantidad variable de inclusiones tau-positivas, que en un caso llevaron a un diagnóstico patológico de tauopatía no clasificable, y en dos de ellos al diagnóstico patológico asociado de enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos apuntan a un papel patogénico limitado de la variante p.A152T en *MAPT*, con poca influencia en el fenotipo clínico, pero con posible influencia en la neuropatología, confiriendo a estos pacientes una mayor propensión a desarrollar patología tau cerebral.

Este hallazgo nos hace además reflexionar sobre la heredabilidad de las enfermedades neurodegenerativas complejas. La existencia de una amplia variabilidad fenotípica, la presencia de portadores de mutaciones supuestamente patógenas que no llegan a desarrollar la enfermedad y de casos aparentemente esporádicos hace pensar que las mutaciones consideradas clásicamente como patógenas o monogénicas puedan ejercer su efecto en función del contexto genético en el que aparezcan. En este contexto genético puede haber mutaciones, o variantes asociadas, que aumenten o reduzcan la penetrancia de la mutación “principal”, y abren la posibilidad de una herencia oligogénica para la DLFT. La herencia oligogénica se ha propuesto para la esclerosis lateral amiotrófica¹³², pero no se ha evaluado sistemáticamente para la DLFT. Se han descrito en los últimos años casos con

mutaciones “dobles”, es decir combinaciones habitualmente de mutaciones o variantes en *GRN*, *MAPT* y *TARDBP*, con expansiones en *C9ORF72*^{133,134,135,136,137,138} y factores genéticos modificadores del fenotipo de diferentes mutaciones (*GRN* y *C9ORF72*), como *TMEM106B*^{38,39,40,41}. Estos hallazgos sugieren, según este modelo de oligogenicidad, que más de un factor genético está implicado en la patogénesis de la enfermedad. Es probable que en los próximos años con la disponibilidad de las nuevas técnicas de secuenciación genética el análisis de familias con una mutación patógena ya conocida, que clásicamente eran excluidas de otros estudios genéticos, ayude a entender los mecanismos de las enfermedades neurodegenerativas complejas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con la mutación c.709-1G>A en *GRN* presentan un fenotipo clínico variable, pero caracterizado por una demencia de curso relativamente rápido, con un diagnóstico de demencia frontotemporal variante conductual o de afasia progresiva no fluente como síndromes de presentación más frecuentes, y con una afectación parietal y un diagnóstico secundario de síndrome corticobasal en un alto porcentaje de los enfermos.
2. La edad de inicio de la enfermedad en los sujetos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* es variable, y el polimorfismo en el codón 129 del gen *PRNP* podría actuar como factor modificador de la edad de inicio. Los sujetos homocigotos para metionina (MM) presentan una edad de inicio media de la enfermedad 8.5 años menor que los sujetos portadores de al menos una valina (MV o VV) en el codón 129 del gen *PRNP*.
3. Los sujetos presintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* presentan alteraciones psicométricas leves en pruebas de atención, flexibilidad mental y lenguaje, que pueden ser detectadas tiempo antes del inicio de la enfermedad.
4. Los sujetos presintomáticos portadores de la mutación c.709-1G>A en *GRN* presentan en la neuroimagen estructural un adelgazamiento cortical en relación con la edad, diferente al de los controles no portadores de la mutación, observado en regiones temporales laterales.
5. En las familias de origen vasco con la mutación c.709-1G>A en *GRN* estudiadas, la coexistencia de la variante p.A152T en *MAPT* parece no tener influencia sobre el fenotipo clínico, pero podría modificar el fenotipo neuropatológico y constituir un modelo de oligogenicidad en degeneración lobar frontotemporal.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006;442(7105):916-919. doi:10.1038/nature05016.
2. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006;442(7105):920-924. doi:10.1038/nature05017.
3. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al. Frontotemporal lobar degeneration. 1998;(Ag 10123).
4. Ng ASL, Rademakers R, Miller BL. Frontotemporal dementia: a bridge between dementia and neuromuscular disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2014:n/a - n/a. doi:10.1111/nyas.12638.
5. Rohrer JD, Warren JD. Phenotypic signatures of genetic frontotemporal dementia. *Curr Opin Neurol*. 2011;24(6):542-549. doi:10.1097/WCO.0b013e32834cd442.
6. Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Munoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain*. 2005;128(Pt 9):1996-2005. doi:10.1093/brain/awh598.
7. Piguet O, Hornberger M, Mioshi E, Hodges JR. Behavioural-variant frontotemporal dementia: diagnosis, clinical staging, and management. *Lancet Neurol*. 2011;10(2):162-172. doi:10.1016/S1474-4422(10)70299-4.
8. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011;134(Pt 9):2456-2477. doi:10.1093/brain/awr179.
9. Whitwell JL, Przybelski S a, Weigand SD, et al. Distinct anatomical subtypes of the behavioural variant of frontotemporal dementia: a cluster analysis study. *Brain*. 2009;132(Pt 11):2932-2946. doi:10.1093/brain/awp232.
10. Gorno-Tempini ML, Hillis a E, Weintraub S, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011;76(11):1006-1014. doi:10.1212/WNL.0b013e31821103e6.

11. Josephs K a, Duffy JR, Strand E a, et al. Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. *Brain*. 2006;129(Pt 6):1385-1398. doi:10.1093/brain/awl078.
12. Rogalski E, Cobia D, Harrison TM, Wieneke C, Weintraub S, Mesulam M-M. Progression of language decline and cortical atrophy in subtypes of primary progressive aphasia. *Neurology*. 2011;76(21):1804-1810. doi:10.1212/WNL.0b013e31821ccd3c.
13. Gorno-Tempini ML, Dronkers NF, Rankin KP, et al. Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol*. 2004;55(3):335-346. doi:10.1002/ana.10825.
14. Mackenzie IR a, Neumann M, Bigio EH, et al. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol*. 2009;117(1):15-18. doi:10.1007/s00401-008-0460-5.
15. Mackenzie IR a, Neumann M, Bigio EH, et al. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):1-4. doi:10.1007/s00401-009-0612-2.
16. Mackenzie IR a, Neumann M, Baborie A, et al. A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta Neuropathol*. 2011;122(1):111-113. doi:10.1007/s00401-011-0845-8.
17. Irwin DJ, Cairns NJ, Grossman M, et al. Frontotemporal lobar degeneration: defining phenotypic diversity through personalized medicine. *Acta Neuropathol*. 2014;129(4):469-491. doi:10.1007/s00401-014-1380-1.
18. Mackenzie IR a, Munoz DG, Kusaka H, et al. Distinct pathological subtypes of FTLD-FUS. *Acta Neuropathol*. 2011;121(2):207-218. doi:10.1007/s00401-010-0764-0.
19. Seeley WW, Crawford RK, Zhou J, Miller BL, Greicius MD. Neurodegenerative diseases target large-scale human brain networks. *Neuron*. 2009;62(1):42-52. doi:10.1016/j.neuron.2009.03.024.
20. Goldman JS, Farmer JM, Wood EM, et al. Comparison of family histories in FTLD subtypes and related tauopathies. *Neurology*. 2005;65(11):1817-1819. doi:10.1212/01.wnl.0000187068.92184.63.
21. Seelaar H, Kamphorst W, Rosso SM, et al. Distinct genetic forms of

- frontotemporal dementia. *Neurology*. 2008;71(16):1220-1226.
doi:10.1212/01.wnl.0000319702.37497.72.
22. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393(6686):702-705. doi:10.1038/31508.
 23. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7737-7741. doi:10.1073/pnas.95.13.7737.
 24. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011;72(2):245-256.
doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011.
 25. Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011;72(2):257-268. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.010.
 26. Watts GDJ, Wymer J, Kovach MJ, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*. 2004;36(4):377-381. doi:10.1038/ng1332.
 27. Gitcho M a, Bigio EH, Mishra M, et al. TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol*. 2009;118(5):633-645. doi:10.1007/s00401-009-0571-7.
 28. Borroni B, Bonvicini C, Alberici a, et al. Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Hum Mutat*. 2009;30(11):E974-E983. doi:10.1002/humu.21100.
 29. Moreno F, Rabinovici GD, Karydas A, et al. A novel mutation P112H in the TARDBP gene associated with frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease and abundant neuritic amyloid plaques. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3(1):19. doi:10.1186/s40478-015-0190-6.
 30. Yan J, Deng HX, Siddique N, et al. Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology*. 2010;75(9):807-814. doi:10.1212/WNL.0b013e3181f07e0c.
 31. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, et al. Mutations in the endosomal

- ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet.* 2005;37(8):806-808. doi:10.1038/ng1609.
32. Rubino E, Rainero I, Chio a., et al. SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2012;79(15):1556-1562. doi:10.1212/WNL.0b013e31826e25df.
33. Ber I Le, Camuzat A, Guerreiro R, Bouya- K. Europe PMC Funders Group SQSTM1 Mutations in French Patients With Frontotemporal Dementia or Frontotemporal Dementia With Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2014;70(11):1403-1410. doi:10.1001/jamaneurol.2013.3849.SQSTM1.
34. Deng H-X, Chen W, Hong S-T, Boycott KM. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult onset ALS and ALS/dementia. *Nature.* 2012;477(7363):211-215. doi:10.1038/nature10353.Mutations.
35. Synofzik M, Maetzler W, Grehl T, et al. Screening in ALS and FTD patients reveals 3 novel UBQLN2 mutations outside the PXX domain and a pure FTD phenotype. *Neurobiol Aging.* 2012;33(12):2949 e13-e17. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.002.
36. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chausseot A, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain.* 2014;137(8):2329-2345. doi:10.1093/brain/awu138.
37. Deerlin VM Van, Sleiman PM a, Martinez-lage M, et al. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet.* 2010;42(3):234-239. doi:10.1038/ng.536.Common.
38. Cruchaga C, Graff C, Chiang H-H, et al. Association of TMEM106B gene polymorphism with age at onset in granulin mutation carriers and plasma granulin protein levels. *Arch Neurol.* 2011;68(5):581-586. doi:10.1001/archneurol.2010.350.
39. Finch N, Carrasquillo MM, Baker M, et al. TMEM106B regulates progranulin levels and the penetrance of FTLD in GRN mutation carriers. *Neurology.* 2011;76(5):467-474. doi:10.1212/WNL.0b013e31820a0e3b.
40. Gallagher MD, Suh E, Grossman M, et al. TMEM106B is a genetic modifier of frontotemporal lobar degeneration with C9orf72 hexanucleotide repeat expansions. *Acta Neuropathol.* 2014;127(3):407-418. doi:10.1007/s00401-013-

- 1239-x.
41. van Blitterswijk M, Mullen B, Nicholson AM, et al. TMEM106B protects C9ORF72 expansion carriers against frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol.* 2014;127(3):397-406. doi:10.1007/s00401-013-1240-4.
 42. Ferrari R, Hernandez DG, Nalls MA, Rohrer JD, Ramasamy A KJ, Dobson-Stone C, Brooks WS, Schofield PR, Halliday GM, Hodges JR PO, Bartley L, Thompson E, Haan E, Hernández I, Ruiz A, Boada M, Borroni B P, et al. Frontotemporal dementia and its subtypes: a genome-wide association study. *Lancet Neurol.* 2014;13(7):686-699. doi:10.1016/S1474-4422(14)70065-1.Frontotemporal.
 43. Thelen M, Razquin C, Hernández I, et al. Investigation of the role of rare TREM2 variants in frontotemporal dementia subtypes. *Neurobiol Aging.* 2014;35(11):2657.e13-e2657.e19. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.018.
 44. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013;368(2):117-127. doi:10.1056/NEJMoa1211851.
 45. Rayaprolu S, Mullen B, Baker M, et al. TREM2 in neurodegeneration: evidence for association of the p.R47H variant with frontotemporal dementia and Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2013;8:19. doi:10.1186/1750-1326-8-19.
 46. Coppola G, Chinnathambi S, Lee JJ, et al. Evidence for a role of the rare p.A152T variant in mapt in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer's diseases. *Hum Mol Genet.* 2012;21(15):3500-3512. doi:10.1093/hmg/dds161.
 47. Lee SE, Tartaglia MC, Genc S, et al. Neurodegenerative Disease Phenotypes in Carriers of MAPT p . A152T , A Risk Factor for Frontotemporal Dementia. 2013;27(4):302-309.
 48. Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, et al. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006;15(20):2988-3001. doi:10.1093/hmg/ddl241.
 49. van Swieten JC, Heutink P. Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 2008;7(10):965-974. doi:10.1016/S1474-4422(08)70194-7.
 50. Cenik B, Sephton CF, Kutluk Cenik B, Herz J, Yu G. Progranulin: A Proteolytically Processed Protein at the Crossroads of Inflammation and

- Neurodegeneration. *J Biol Chem.* 2012;287(39):32298-32306.
doi:10.1074/jbc.R112.399170.
51. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HPJ, Bateman A. Structure, function, and mechanism of progranulin; The brain and beyond. *J Mol Neurosci.* 2011;45(3):538-548. doi:10.1007/s12031-011-9569-4.
52. Zhu J, Nathan C, Jin W, et al. Conversion of Proepithelin to Epithelins. *Cell.* 2002;111(6):867-878. doi:10.1016/S0092-8674(02)01141-8.
53. Tang W, Lu Y, Tian Q-Y, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science.* 2011;332(6028):478-484. doi:10.1126/science.1199214.
54. Hu F, Padukkavidana T, Vægter CB, et al. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron.* 2010;68(4):654-667. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.034.
55. Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience.* 2013;231(December):49-60. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.11.032.
56. Laird AS, Van Hoecke A, De Muynck L, et al. Progranulin is neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PLoS One.* 2010;5(10):e13368. doi:10.1371/journal.pone.0013368.
57. Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D, et al. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Biol.* 2008;181(1):37-41. doi:10.1083/jcb.200712039.
58. Petkau TL, Neal SJ, Milnerwood A, et al. Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiol Dis.* 2012;45(2):711-722. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.016.
59. Petkau TL, Leavitt BR. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* May 2014;1-11. doi:10.1016/j.tins.2014.04.003.
60. Bossù P, Salani F, Alberici A, et al. Loss of function mutations in the progranulin gene are related to pro-inflammatory cytokine dysregulation in frontotemporal lobar degeneration patients. *J Neuroinflammation.* 2011;8(1):65. doi:10.1186/1742-2094-8-65.

61. Guo A, Tapia L, Bamji SX, Cynader MS, Jia W. Progranulin deficiency leads to enhanced cell vulnerability and TDP-43 translocation in primary neuronal cultures. *Brain Res.* 2010;1366:1-8. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.099.
62. Zhang Y-J, Xu Y -f., Dickey CA, et al. Progranulin Mediates Caspase-Dependent Cleavage of TAR DNA Binding Protein-43. *J Neurosci.* 2007;27(39):10530-10534. doi:10.1523/JNEUROSCI.3421-07.2007.
63. Alquézar C, Esteras N, de la Encarnación A, et al. PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from frontotemporal lobar degeneration-progranulin mutation carriers. *Neurobiol Aging.* 2014;35(4):886-898. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.021.
64. Alquezar C, Esteras N, Alzualde A, et al. Inactivation of CDK/pRb pathway normalizes survival pattern of lymphoblasts expressing the FTLD-progranulin mutation c.709-1G>A. *PLoS One.* 2012;7(5):e37057. doi:10.1371/journal.pone.0037057.
65. Alquezar C, Esteras N, Bartolomé F, et al. Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLD-TDP dementia. *Neurobiol Aging.* 2012;33(2):429.e7-e20. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.020.
66. Alquezar C, Esteras N, Encarnación AD La, Moreno F, de Munain AL, Martín-Requero Á. Increasing progranulin levels and blockade of the ERK1/2 pathway: Upstream and downstream strategies for the treatment of progranulin deficient frontotemporal dementia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(3):386-403. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.12.007.
67. Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, Binetti G. Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology.* 2008;71(16):1235-1239. doi:10.1212/01.wnl.0000325058.10218.fc.
68. Finch N, Baker M, Crook R, et al. Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain.* 2009;132(Pt 3):583-591. doi:10.1093/brain/awn352.
69. Sleegers K, Brouwers N, Van Damme P, et al. Serum biomarker for progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol.* 2009;65(5):603-609. doi:10.1002/ana.21621.

70. Pickering-Brown SM, Rollinson S, Du Plessis D, et al. Frequency and clinical characteristics of progranulin mutation carriers in the Manchester frontotemporal lobar degeneration cohort: comparison with patients with MAPT and no known mutations. *Brain*. 2008;131(Pt 3):721-731. doi:10.1093/brain/awm331.
71. Kelley BJ, Haidar W, Boeve BF, et al. Prominent phenotypic variability associated with mutations in Progranulin. *Neurobiol Aging*. 2009;30(5):739-751. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.022.
72. Snowden JS, Pickering-Brown SM, Mackenzie IR, et al. Progranulin gene mutations associated with frontotemporal dementia and progressive non-fluent aphasia. *Brain*. 2006;129(Pt 11):3091-3102. doi:10.1093/brain/awl267.
73. Rademakers R, Baker M, Gass J, et al. Phenotypic variability associated with progranulin haploinsufficiency in patients with the common 1477C-->T (Arg493X) mutation: an international initiative. *Lancet Neurol*. 2007;6(10):857-868. doi:10.1016/S1474-4422(07)70221-1.
74. Beck J, Rohrer JD, Campbell T, et al. A distinct clinical, neuropsychological and radiological phenotype is associated with progranulin gene mutations in a large UK series. *Brain*. 2008;131(Pt 3):706-720. doi:10.1093/brain/awm320.
75. Le Ber I, Camuzat A, Hannequin D, et al. Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study. *Brain*. 2008;131(Pt 3):732-746. doi:10.1093/brain/awn012.
76. Masellis M, Momeni P, Meschino W, et al. Novel splicing mutation in the progranulin gene causing familial corticobasal syndrome. *Brain*. 2006;129(Pt 11):3115-3123. doi:10.1093/brain/awl276.
77. Spina S, Murrell JR, Huey ED, et al. Corticobasal syndrome associated with the A9D Progranulin mutation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(10):892-900. doi:10.1097/nen.0b013e3181567873.
78. Benussi L, Ghidoni R, Pegoiani E, Moretti D V, Zanetti O, Binetti G. Progranulin Leu271LeufsX10 is one of the most common FTLD and CBS associated mutations worldwide. *Neurobiol Dis*. 2009;33(3):379-385. doi:10.1016/j.nbd.2008.11.008.
79. Rohrer JD, Ridgway GR, Modat M, et al. Distinct profiles of brain atrophy in frontotemporal lobar degeneration caused by progranulin and tau mutations.

- Neuroimage*. 2010;53(3):1070-1076. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.12.088.
80. Whitwell JL, Jack CR, Baker M, et al. Voxel-Based Morphometry in Frontotemporal Lobar Degeneration With Ubiquitin-Positive Inclusions With and Without Progranulin Mutations. 2007;64.
81. Whitwell JL, Jack CR, Boeve BF, et al. Voxel-based morphometry patterns of atrophy in FTL D with mutations in MAPT or PGRN. *Neurology*. 2009;72(9):813-820. doi:10.1212/01.wnl.0000343851.46573.67.
82. Mackenzie IR a, Baker M, Pickering-Brown S, et al. The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain*. 2006;129(Pt 11):3081-3090. doi:10.1093/brain/awl271.
83. Mackenzie IR a. The neuropathology and clinical phenotype of FTD with progranulin mutations. *Acta Neuropathol*. 2007;114(1):49-54. doi:10.1007/s00401-007-0223-8.
84. López de Munain A, Alzualde A, Gorostidi A, et al. Mutations in Progranulin Gene : Clinical , Pathological , and Ribonucleic Acid Expression Findings. 2008;63(10). doi:10.1016/j.biopsych.2007.08.015.
85. Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S, et al. Genetic variability in progranulin contributes to risk for clinically diagnosed Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;71(9):656-664. doi:10.1212/01.wnl.0000319688.89790.7a.
86. Wojtas A, Heggeli KA, Finch N, et al. C9ORF72 repeat expansions and other FTD gene mutations in a clinical AD patient series from Mayo Clinic. *Am J Neurodegener Dis*. 2012;1(1):107-118.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3560455&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
87. Perry DC, Lehmann M, Yokoyama JS, et al. Progranulin mutations as risk factors for Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2013;70(6):774-778. doi:10.1001/2013.jamaneurol.393.
88. Viswanathan J, Mäkinen P, Helisalmi S, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. An association study between granulin gene polymorphisms and Alzheimer's disease in finnish population. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2009;150(November):747-750. doi:10.1002/ajmg.b.30889.
89. Minami SS, Min S-W, Krabbe G, et al. Progranulin protects against amyloid β

- deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Med*. 2014;20(10):1157-1164. doi:10.1038/nm.3672.
90. Del Bo R, Corti S, Santoro D, et al. No major progranulin genetic variability contribution to disease etiopathogenesis in an ALS Italian cohort. *Neurobiol Aging*. 2011;32(6):1157-1158. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.06.006.
91. Schymick JC, Yang Y, Andersen PM, et al. Progranulin mutations and amyotrophic lateral sclerosis or amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia phenotypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;78(7):754-756. doi:10.1136/jnnp.2006.109553.
92. Nuytemans K, Pals P, Sleegers K, et al. Progranulin variability has no major role in Parkinson disease genetic etiology. *Neurology*. 2008;71(15):1147-1151. doi:10.1212/01.wnl.0000327563.10320.2b.
93. Sleegers K, Brouwers N, Maurer-Stroh S, et al. Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008;71(4):253-259. doi:10.1212/01.wnl.0000289191.54852.75.
94. Fenoglio C, Scalabrini D, Esposito F, et al. Progranulin gene variability increases the risk for primary progressive multiple sclerosis in males. *Genes Immun*. 2010;11(6):497-503. doi:10.1038/gene.2010.18.
95. Galimberti D, Dell'Osso B, Fenoglio C, et al. Progranulin gene variability and plasma levels in bipolar disorder and schizophrenia. *PLoS One*. 2012;7(4):e32164. doi:10.1371/journal.pone.0032164.
96. Galimberti D, Prunas C, Paoli RA, et al. Progranulin gene variability influences the risk for bipolar I disorder, but not bipolar II disorder. *Bipolar Disord*. 2014;(4):1-4. doi:10.1111/bdi.12180.
97. Smith KR, Damiano J, Franceschetti S, et al. Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *Am J Hum Genet*. 2012;90(6):1102-1107. doi:10.1016/j.ajhg.2012.04.021.
98. Rohrer JD, Warren JD, Omar R, et al. Parietal lobe deficits in frontotemporal lobar degeneration caused by a mutation in the progranulin gene. *Arch Neurol*. 2008;65(4):506-513. doi:10.1001/archneur.65.4.506.
99. Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Sleiman PM a, et al. Genetic and clinical features of progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Arch*

- Neurol.* 2011;68(4):488-497. doi:10.1001/archneurol.2011.53.
100. Blázquez L, Otaegui D, Sáenz a, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2006;406(3):235-239. doi:10.1016/j.neulet.2006.07.037.
 101. Baker M, Litvan I, Houlden H, et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. 1999;8(4):711-715.
 102. Bruni a C, Momeni P, Bernardi L, et al. Heterogeneity within a large kindred with frontotemporal dementia: a novel progranulin mutation. *Neurology.* 2007;69(2):140-147. doi:10.1212/01.wnl.0000265220.64396.b4.
 103. Nicholson AM, Finch N a., Wojtas A, et al. TMEM106B p.T185S regulates TMEM106B protein levels: Implications for frontotemporal dementia. *J Neurochem.* 2013;126(6):781-791. doi:10.1111/jnc.12329.
 104. Chen-Plotkin AS, Unger TL, Gallagher MD, et al. TMEM106B, the risk gene for frontotemporal dementia, is regulated by the microRNA-132/212 cluster and affects progranulin pathways. *J Neurosci.* 2012;32(33):11213-11227. doi:10.1523/JNEUROSCI.0521-12.2012.
 105. Lang CM, Fellerer K, Schwenk BM, et al. Membrane orientation and subcellular localization of transmembrane protein 106B (TMEM106B), a major risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *J Biol Chem.* 2012;287(23):19355-19365. doi:10.1074/jbc.M112.365098.
 106. Rademakers R, Eriksen JL, Baker M, et al. Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 2008;17(23):3631-3642. doi:10.1093/hmg/ddn257.
 107. Mead S. Prion disease genetics. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(3):273-281. doi:10.1038/sj.ejhg.5201544.
 108. Golanska E, Bigoszevska KH, Rutkiewicz E, et al. Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD. 2009.
 109. He J, Li X, Yang J, et al. The association between the methionine/valine (M/V) polymorphism (rs1799990) in the PRNP gene and the risk of Alzheimer disease: An update by meta-analysis. *J Neurol Sci.* 2013;326(1-2):89-95. doi:10.1016/j.jns.2013.01.020.

110. Combarros O, Guerra MS, Llorca J, et al. Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene is not associated with sporadic AD. 2009.
111. Cousin E, Macé S, Rocher C, et al. No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011;32(8):1443-1451. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.09.004.
112. Sassi C, Guerreiro R, Gibbs R, et al. Investigating the role of rare coding variability in Mendelian dementia genes (APP, PSEN1, PSEN2, GRN, MAPT, and PRNP) in late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35(12):2881.e1-e2881.e6. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.002.
113. Calero O, Bullido MJ, Clarimón J, et al. Genetic cross-interaction between APOE and PRNP in sporadic Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob diseases. *PLoS One*. 2011;6(7):e22090. doi:10.1371/journal.pone.0022090.
114. Li X, Rowland LP, Mitsumoto H, et al. Prion protein codon 129 genotype prevalence is altered in primary progressive aphasia. *Ann Neurol*. 2005;58(6):858-864. doi:10.1002/ana.20646.
115. Rohrer JD, Mead S, Omar R, et al. Prion protein (PRNP) genotypes in frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Ann Neurol*. 2006;60(5):616; author reply 617. doi:10.1002/ana.20931.
116. van Blitterswijk M, Mullen B, Wojtas A, et al. Genetic modifiers in carriers of repeat expansions in the C9ORF72 gene. *Mol Neurodegener*. 2014;9(1):38. doi:10.1186/1750-1326-9-38.
117. Borroni B, Alberici A, Cercignani M, et al. Granulin mutation drives brain damage and reorganization from preclinical to symptomatic FTL. *Neurobiol Aging*. 2012;33(10):2506-2520. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.031.
118. Dopper EGP, Rombouts S a RB, Jiskoot LC, et al. Structural and functional brain connectivity in presymptomatic familial frontotemporal dementia. *Neurology*. 2013;80(9):814-823. doi:10.1212/WNL.0b013e31828407bc.
119. Pievani M, Paternicò D, Benussi L, et al. Pattern of structural and functional brain abnormalities in asymptomatic granulin mutation carriers. *Alzheimers Dement*. 2014;10(5S):S354-S363.e1. doi:10.1016/j.jalz.2013.09.009.
120. Hallam BJ, Jacova C, Hsiung G-YR, et al. Early neuropsychological characteristics of progranulin mutation carriers. *J Int Neuropsychol Soc*.

- 2014;20(7):694-703. doi:10.1017/S1355617714000551.
121. Rohrer JD, Nicholas JM, Cash DM, et al. Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) study : a cross-sectional analysis. 2015;4422(14):1-10. doi:10.1016/S1474-4422(14)70324-2.
 122. Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, et al. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage*. 2006;31(3):968-980. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.01.021.
 123. Borroni B, Alberici a, Premi E, et al. Brain magnetic resonance imaging structural changes in a pedigree of asymptomatic progranulin mutation carriers. *Rejuvenation Res*. 2008;11(3):585-595. doi:10.1089/rej.2007.0623.
 124. Jacova C, Hsiung G-YR, Tawankanjanachot I, et al. Anterior brain glucose hypometabolism predates dementia in progranulin mutation carriers. *Neurology*. 2013;81(15):1322-1331. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a8237e.
 125. Doppert EGP, Rombouts S a RB, Jiskoot LC, et al. Structural and functional brain connectivity in presymptomatic familial frontotemporal dementia. *Neurology*. 2013;80(9):814-823. doi:10.1212/WNL.0b013e31828407bc.
 126. Pievani M, Paternicò D, Benussi L, et al. Pattern of structural and functional brain abnormalities in asymptomatic granulin mutation carriers. *Alzheimer's Dement*. 2014;10:354-364. doi:10.1016/j.jalz.2013.09.009.
 127. Premi E, Formenti A, Gazzina S, et al. Effect of TMEM106B polymorphism on functional network connectivity in asymptomatic GRN mutation carriers. *JAMA Neurol*. 2014;71(2):216-221. doi:10.1001/jamaneurol.2013.4835.
 128. Premi E, Cauda F, Gasparotti R, et al. Multimodal fMRI Resting-State Functional Connectivity in Granulin Mutations: The Case of Fronto-Parietal Dementia. *PLoS One*. 2014;9(9):e106500. doi:10.1371/journal.pone.0106500.
 129. Caroppo P, Habert M-O, Durrleman S, et al. Lateral Temporal Lobe: An Early Imaging Marker of the Presymptomatic GRN Disease? *J Alzheimer's Dis*. 2015;47(3):751-759. doi:10.3233/JAD-150270.
 130. Walsh B. Estimating the Time to the Most Recent Common Ancestor for the Y chromosome or Mitochondrial DNA for a Pair of Individuals. 2001.

131. Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, et al. A high-resolution recombination map of the human genome. 2002;31(july):241-247. doi:10.1038/ng917.
132. Van Blitterswijk M, Van Es M a., Hennekam E a M, et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2012;21(17):3776-3784. doi:10.1093/hmg/dds199.
133. Chio a., Restagno G, Brunetti M, et al. ALS/FTD phenotype in two Sardinian families carrying both C9ORF72 and TARDBP mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(7):730-733. doi:10.1136/jnnp-2012-302219.
134. Kaivorinne A-L, Moilanen V, Kervinen M, et al. Novel TARDBP Sequence Variant and C9ORF72 Repeat Expansion in a Family With Frontotemporal Dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2012;28(2):1. doi:10.1097/WAD.0b013e318266fae5.
135. King A, Al-Sarraj S, Troakes C, et al. Mixed tau, TDP-43 and p62 pathology in FTL associated with a C9ORF72 repeat expansion and p.Ala239Thr MAPT (tau) variant. *Acta Neuropathol.* 2013;125(2):303-310. doi:10.1007/s00401-012-1050-0.
136. Lashley T, Rohrer JD, Mahoney C, et al. A pathogenic progranulin mutation and C9orf72 repeat expansion in a family with frontotemporal dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(4):502-513. doi:10.1111/nan.12100.
137. Mignarri A, Battistini S, Tomai Pitinca ML, et al. Double trouble? Progranulin mutation and C9ORF72 repeat expansion in a case of primary non-fluent aphasia. *J Neurol Sci.* 2014;341(1-2):176-178. doi:10.1016/j.jns.2014.03.030.
138. van Blitterswijk M, Baker MC, DeJesus-Hernandez M, et al. C9ORF72 repeat expansions in cases with previously identified pathogenic mutations. *Neurology.* 2013;81(15):1332-1341. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a8250c.

OTRAS PUBLICACIONES DEL AUTOR RELACIONADAS

DESCRIPCIÓN INICIAL DE LA MUTACIÓN C.709-1G>A EN *GRN* Y PUBLICACIONES RELACIONADAS CON MECANISMOS MOLECULARES DE NEURODEGENERACIÓN

1. López de Munáin A, Alzualde A, Gorostidi A,... **Moreno F**, et al. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol Psychiatry*. 2008; 63 (10): 946-952.
2. Alquezar C, Esteras N, Bartolomé F, et al. Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTLD-TDP dementia. *Neurobiol Aging*. 2012; 33 (2): 429.e7-20.
3. Alquezar C, Esteras N, Alzualde A, **Moreno F**, et al. Inactivation of CDK/pRb pathway normalizes survival pattern of lymphoblasts expressing the FTLD-progranulin mutation c.709-1G>A. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e37057.
4. Alquézar C, Esteras N, de la Encarnación A, Alzualde A, **Moreno F**, et al. PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from frontotemporal lobar degeneration-progranulin mutation carriers. *Neurobiol Aging*. 2014; 35 (4): 886-98.
5. Alquezar C, Esteras N, Encarnación Ade L, **Moreno F**, et al. Increasing progranulin levels and blockade of the ERK1/2 pathway: Upstream and downstream strategies for the treatment of progranulin deficient frontotemporal dementia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015; 25 (3): 386-403.
6. Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Sleiman PM,...**Moreno F**, et al. Genetic and clinical features of progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol*. 2011; 68 (4): 488-97.

RELACIONADAS CON LA VARIANTE P.A152T EN EL GEN *MAPT*

1. Lee SE, Tartaglia MC, Yener G,...**Moreno F**, et al. Neurodegenerative disease phenotypes in carriers of MAPT p.A152T, a risk factor for frontotemporal

- dementia spectrum disorders and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2013; 27 (4): 302-9.
2. Pastor P, **Moreno F**, Clarimón J, et al. MAPT H1 Haplotype is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease Risk in APOE ϵ 4 Noncarriers: Results from the Dementia Genetics Spanish Consortium. *J Alzheimers Dis.* 2015 Sep 29; 49 (2): 343-52.

RELACIONADAS CON LA DEMENCIA FRONTOTEMPORAL

1. Van Deerlin VM, Sleiman PM, Martinez-Lage M, ...**Alzualde A**, **López de Munáin A**, et al. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet.* 2010; 42 (3): 234-9.
2. Alzualde A, Indakoetxea B, Ferrer I, **Moreno F**, et al. A novel PRNP Y218N mutation in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69 (8): 789-800.
3. Ruiz A, Dols-Icardo O, Bullido MJ,...**Moreno F**...; dementia genetic Spanish consortium (DEGESCO). Assessing the role of the TREM2 p.R47H variant as a risk factor for Alzheimer's disease and frontotemporal dementia). *Neurobiol Aging.* 2014; 35 (2): 444.e1-4.
4. Thelen M, Razquin C, Hernández I,...**Moreno F**...; Dementia Genetics Spanish Consortium (DEGESCO). Investigation of the role of rare TREM2 variants in frontotemporal dementia subtypes. *Neurobiol Aging.* 2014; 35 (11): 2657.e13-9.
5. **Moreno F**, Rabinovici GD, Karydas A, et al. A novel mutation P112H in the TARDBP gene associated with frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease and abundant neuritic amyloid plaques. *Acta Neuropathol Commun.* 2015 ; 3 (1): 19.

ANEXOS

“Frontotemporoparietal” dementia

Clinical phenotype associated with the c.709-1G>A *PGRN* mutation

F. Moreno, MD*
B. Indakoetxea, MD*
M. Barandiaran, MD
A. Alzualde, PhD
A. Gabilondo, MD
A. Estanga, MD
J. Ruiz, MD
M. Ruibal, MD
A. Bergareche, MD
J.F. Martí-Massó, MD,
PhD
A. López de Munain,
MD, PhD

Address correspondence and reprint requests to Dr. Fermin Moreno Izco, Department of Neurology, Hospital Donostia, Paseo Dr. Begiristain sn, CP 20014, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain
fermin.morenoizco@osakidetza.net

ABSTRACT

Background: Mutations in the progranulin gene (*PGRN*) are a major cause of frontotemporal lobar degeneration with tau-negative and ubiquitin-positive neuronal inclusions. Most previous studies aimed at characterizing the clinical and neuropsychological phenotype of *PGRN* mutation carriers included patients with different *PGRN* mutations, assuming that the common proposed pathogenetic mechanism of haploinsufficiency will lead to a comparable phenotype.

Methods: We studied 21 patients with a single pathogenic splicing mutation in the *PGRN* gene (c.709-1G>A) in the same tertiary referral center using homogenous diagnostic criteria and protocols. All patients were of Basque descent.

Results: Patients exhibited a variable phenotype both in age at onset and initial symptoms. Behavioral variant frontotemporal dementia (52.4%) and progressive nonfluent aphasia (23.8%) were the most common presenting syndromes. Apathy was the most common behavioral symptom. Patients developed a relatively rapidly progressive dementia with features that led to a secondary diagnosis in 61.9% of cases 2 years after primary diagnosis. Notably, this secondary or tertiary diagnosis was corticobasal syndrome in 47.6% of cases, which confirmed the neuropsychological features of parietal lobe dysfunction seen at the initial assessment in 81.8% of patients.

Conclusions: Patients carrying the c.709-1G>A mutation in the *PGRN* gene showed heterogeneous clinical and neuropsychological features and commonly developed corticobasal syndrome as the disease progressed. *Neurology*® 2009;73:1367-1374

GLOSSARY

bvFTD = behavioral variant of frontotemporal dementia; **CBS** = corticobasal syndrome; **CERAD** = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; **FTLD** = frontotemporal lobar degeneration; **MMSE** = Mini-Mental State Examination; **PNFA** = progressive nonfluent aphasia.

Progranulin (*PGRN*) gene mutations, first described in 2006,^{1,2} are a frequent genetic cause of frontotemporal lobar degeneration (FTLD). More than 60 pathogenic point mutations and some deletions in the *PGRN* gene have been identified (www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations). All of these mutations are characterized by a relatively similar pathogenetic mechanism (haploinsufficiency) and a variable clinical phenotype even within families.

Patients with *PGRN* mutations have been diagnosed with a wide variety of clinical conditions in different series: behavioral variant of frontotemporal dementia (bvFTD), primary progressive aphasia, mainly in the form of progressive nonfluent aphasia (PNFA), Alzheimer disease, corticobasal syndrome (CBS), or Lewy body dementia.³⁻¹² Most previous series included patients with different *PGRN* mutations, in the assumption that mutations causing a similar molecular effect (protein loss) will lead to a comparable phenotype.

Our group identified the c.709-1G>A (Ala237Trpfsx4) mutation in patients with frontotemporal dementia, a high proportion of whom developed CBS.¹⁰ This is a splicing mutation that causes

*These authors contributed equally.

From the Department of Neurology (F.M., B.I., M.B., A.G., J.R., J.F.M.-M., A.L.d.M.), Hospital Donostia; Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) (F.M., B.I., M.B., A.A., A.G., J.R., J.F.M.M., A.L.d.M.); Neurogenetics Research Unit (A.A., A.E.), Ilundain Fundazioa-Instituto Biodonostia; Department of Medicine (M.R.), Division of Neurology, Hospital Zumarraga; and Department of Medicine (A.B.), Division of Neurology, Hospital Bidasoa, Gipuzkoa, Spain.

Supported by Diputación Foral de Gipuzkoa (dossier 76/08) and the Basque Government (SAIOTEK program).

Disclosure: Author disclosures are provided at the end of the article.

degradation of the RNA derived from the mutated allele by nonsense-mediated decay. All patients were of Basque origin. The native Basque population has its own ethnic, cultural, and linguistic characteristics and little genetic exchange with neighboring populations.¹³ We selected patients with the c.709-1G>A mutation in *PGRN* to exclude potential differences in the phenotype due to the inclusion of subjects carrying different *PGRN* mutations.

The objective of this study was to characterize the clinical and neuropsychological profile of patients with the c.709-1G>A mutation, focusing on neuropsychological features at first examination and on the evolving patterns of clinical syndromes.

METHODS Patient recruitment and clinical information.

A total of 247 patients with a clinical diagnosis of frontotemporal dementia (bvFTD, PNFA, or semantic dementia) and the related syndromes CBS and progressive supranuclear palsy were included from the following hospitals in Gipuzkoa between 1995 and 2008: Bidasoa, Mendara, Zumarraga, and Nuestra Señora de la Asunción Hospitals, and the tertiary referral center, Hospital Donostia. A total of 220 patients had no mutation in *PGRN*; 23 had the c.709-1G>A mutation in *PGRN* and 4 patients had other mutations in *PGRN* whose pathogenic nature is unclear. Patients carrying the c.709-1G>A mutation in *PGRN* were selected for the study.

Clinical diagnosis was considered as primary, secondary, or tertiary depending on the order in which specific traits appeared.¹⁴ bvFTD was diagnosed if the dominant features included executive dysfunction, personality changes, behavioral dyscontrol, lack of empathy, apathy, food preferences, or obsessive and compulsive behaviors. PNFA was diagnosed if there was a 6-month history of difficulty with expressive speech characterized by at least 3 of the following: nonfluency (reduced numbers of words per utterance), speech hesitancy or labored speech, and word-finding difficulty or agrammatism.¹⁵ CBS was diagnosed if asymmetric extrapyramidal features and prominent apraxia were present, with or without alien hand phenomena or other cortical features. Clinical diagnosis was validated in a meeting of 3 experienced neurologists (F.M., B.I., and A.L.d.M.) and a neuropsychologist (M.B.) according to these criteria. Behavioral symptoms were ascertained by discussion with the patient's informant. Follow-up visits were scheduled every 6 months, although due to the complicated personal and familial context of some patients, this schedule was difficult to accomplish.

Relatives at risk were invited to participate in a prospective longitudinal study. The aim of this study was to investigate potential phenotype modifiers and to clearly establish early symptoms of disease. A total of 59 asymptomatic at-risk individuals were analyzed for the presence of mutations in *PGRN*. A total of 20 asymptomatic at-risk patients carried the c.709-1G>A mutation in the *PGRN* gene and were included in the age-disease penetrance analysis.

Neuropsychological evaluation. Neuropsychological assessment consisted of a battery of cognitive tests. Overall cognitive status was assessed using the Mini-Mental State Examination (MMSE).¹⁶ Verbal episodic memory was tested using the word list memory of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD).¹⁷ Spontaneous language was assessed during

clinical interview, and patients were also asked to describe the sheet from the Boston Diagnostic Aphasia Examination test¹⁸ focusing on fluency, verbal generation, phonetics, articulation, prosody, content, and the presence of phonemic or semantic paraphasias. Comprehension, speech repetition, and ideomotor praxis were tested using a subtest of the Barcelona Test.¹⁹ Semantic (animals) and phonologic (words beginning with "p") fluency were also tested.²⁰ The clinical assessment battery of the CERAD protocol was used to test constructional praxis.¹⁷ Executive function was assessed using the frontal assessment battery.²¹

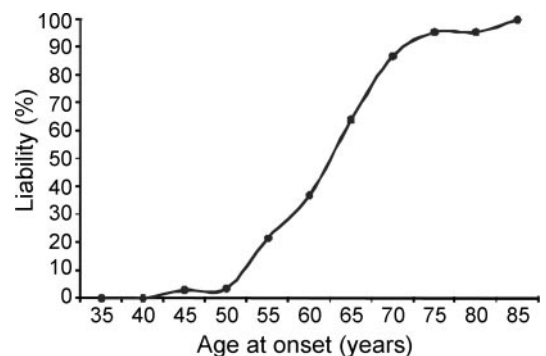
Molecular procedures. Blood samples were taken from patients for genomic studies. DNA was extracted from blood cells using standard procedures. *PGRN* gene sequencing procedures used at our laboratory have been published elsewhere.¹⁰

Patient consents. Written informed consent was obtained from all patients (or guardians of patients) and asymptomatic individuals, and the study was approved by the Donostia Hospital Ethics Board.

RESULTS The c.709-1G>A mutation was identified in 23 patients and 20 asymptomatic subjects from 13 families, all of them of Basque origin. Clinical and neuropsychological evaluation of patients carrying the c.709-1G>A mutation in the *PGRN* gene are reported below.

Clinical features. Detailed clinical data were available from 21 (7 male and 14 female) of the 23 patients with the c.709-1G>A mutation in *PGRN*. Mean follow-up time was 4.7 years.¹⁻¹³ Four patients died after a mean disease duration of 4.75 years. Age at disease onset ranged from 42 to 71 years; mean age at onset was 59.2 ± 7.2 years. Based on these data and on information from 20 asymptomatic c.709-1G>A mutation carriers, a liability curve was constructed to estimate age-related disease penetrance for this *PGRN* mutation. This analysis showed 37% of mutation carriers to be affected by the age of 60, while 87% of carriers were affected at 70 years of age (figure). The case of an 82-

Figure Estimated age-related disease penetrance for the c.709-1G>A *PGRN* mutation



A total of 21 affected and 20 nonaffected mutation carriers were included in the analysis. Penetrance was calculated by 5-year age groups from 35 to 85 years.

Table 1 General clinical and demographic characteristics of 21 *PGRN* mutation carriers

Case	Gender	Age at onset, y	Family history	Primary diagnosis	Secondary diagnosis	Tertiary diagnosis	Duration, y
1	M	61	Yes (dementia with no clear transmission pattern)	AD (7)	CBS (29) (L)	—	4
2	M	52	Yes (sister diagnosed with ALS)	Gerstmann syndrome (35)	AD (38)	—	7*
3	F	66	Yes (autosomal dominant)	PNFA (2)	CBS (26)	—	8
4	F	63	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (3)	CBS (19) (L)	—	3
5	M	70	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (14)	PNFA (14)	CBS (23) (R)	2
6	F	70	Yes (autosomal dominant)	PNFA (11)	bvFTD (14)	—	3
7	F	63	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (9)	CBS (17) (L)	PNFA (25)	6
8	M	53	Yes (autosomal dominant, includes FTD-MND)	PNFA (26)	CBS (26) (L)	—	4*
9	F	71	Yes (autosomal dominant)	AD (17)	CBS (37)	—	4*
10	F	54	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (6)	—	—	1
11	M	51	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (13)	—	—	1
12	F	53	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (6)	—	—	2
13	F	57	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (49)	CBS (60)	—	13
14	M	56	Yes (autosomal dominant)	bvFTD (40)	—	—	5
15	F	66	Yes (autosomal dominant)	PNFA (12)	CBS (65) (R)	—	6
16	F	64	Yes (sister diagnosed with probable AD)	bvFTD (32)	—	—	9
17	M	60	Yes (autosomal dominant)	iPD (14)	CBS (30) (L)	—	4*
18	F	63	Yes (autosomal dominant)	PNFA (20)	bvFTD (43)	—	6
19	F	57	Yes (no clear transmission pattern)	bvFTD (12)	—	—	3
20	F	62	Yes (autosomal dominant)	AD (12)	bvFTD (37)	CBS (42) (L)	7
21	F	42	No (mother diagnosed with a nonspecified psychiatric disorder)	bvFTD	—	—	1

Months from initial symptoms to diagnosis are given in parentheses.

*Dead patients.

AD = Alzheimer disease; CBS = corticobasal syndrome; ALS = amyotrophic lateral sclerosis; PNFA = progressive nonfluent aphasia; bvFTD = behavioral variant frontotemporal dementia; iPD = idiopathic Parkinson's disease; FTD-MND = frontotemporal dementia-motor neuron disease.

year-old woman, a sister of patient 13, is noteworthy. Relatives were concerned about the family history of disease. This woman had no clear behavioral or cognitive dysfunction and had no problem in coping with daily activities of living. Neuropsychological assessment showed mild attentional deficits, impulsivity, and mild executive dysfunction. These deficits remained stable after 1 year. Genetic analysis confirmed that she carried the c.709-1G>A mutation in *PGRN*.

The first clinical syndrome diagnosed was bvFTD in 11 patients (52.4%), progressive nonfluent aphasia in 5 (23.8%), probable AD in 3 (14.3%), PD in 1 (4.8%), and Gerstmann syndrome in the remaining patient (4.8%). Fourteen patients developed a second syndrome. In 9 of these the second diagnosis was CBS (64.3%). A secondary diagnosis was made within 2 years of the primary diagnosis in 13 patients (61.9%). Overall, bvFTD was diagnosed in 14 patients (66.7%), CBS in 10 (47.6%), and PNFA in 7

patients (33.3%). To date, only 3 patients have developed a third clinical syndrome. No patient developed symptoms or signs consistent with diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. Detailed clinical data are available for 8 of the 11 patients who developed CBS at some stage of the disease. Motor signs affected the left side in 75% and the right side in 25% of patients. All of them had rigidity and ideomotor apraxia of the involved limb. Spontaneous or induced myoclonus was seen in 62.5%. Other cortical signs such as agraphesthesia, astereognosis, or alien limb phenomenon were less prevalent, and were noted in only 25%. Demographics, family history, and general characteristics of patients with the c.709-1G>A mutations are summarized in table 1.

Behavioral features. Data on behavioral disorders were obtained in 18 patients. Table 2 summarizes the

Table 2 Behavioral features

Case	Gender/age at onset, y	Apathy	Irritability/aggression	Disinhibition	Impulsivity	Hyperorality/bulimia/compulsive eating	Other compulsive behaviors	Hallucinations/delusions	Depression	Anxiety
1	M/61	+	-	-	+	-	-	-	-	-
2	M/52	-	+	-	-	-	-	-	-	++
4	F/66	-	++	++	+++	-	-	-	-	++
5	F/63	+++	-	+	-	+	-	-	-	+
6	F/70	++	-	+	+++	+++	-	-	-	-
7	F/63	++	-	++	++	+	-	-	+	-
8	M/53	++	-	+	+	-	-	-	+	-
10	F/54	++	-	+	+	+	-	-	+	+
11	M/51	++	-	+	+	-	-	-	-	-
12	F/53	++	-	+	++	+++	+	-	-	+
13	F/57	++	+	-	++	++	-	+	-	-
14	M/56	+++	-	-	+	++	-	-	-	-
15	F/66	+	-	-	+	+	-	-	-	-
16	F/64	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
17	M/60	++	-	-	-	-	-	-	-	-
18	F/63	+	-	-	++	-	-	-	-	-
19	F/57	+++	-	+	+	+	-	-	-	-
20	F/62	++	-	-	+	++	-	-	++	++

+ = Mild (symptoms were not present every day and caused no significant distress to caregivers); ++ = moderate (symptoms were present every day or caused significant distress to caregivers); +++ = severe (symptoms were present every day and caused significant distress to caregivers).

most significant behavioral disorders of patients during follow-up. The most common finding was the presence of apathy in 88.9% of patients. Impulsivity was present in 77.8% of patients, followed by altered eating habits with hyperorality, bulimia, or compulsive eating in 55.5%, and disinhibition in 50%. Irritability or aggression emerged at some point during the course of disease in 16.7% of patients. Only 1 patient (5.6%) had visual hallucinations at disease onset.

Neuropsychological features. Eleven patients underwent a detailed neuropsychological evaluation. Here we focus on the first neuropsychological evaluation, performed between 6 months and 3.5 years after occurrence of the initial symptoms of disease. The MMSE score ranged widely from 5 and 29 points, with a mean of 19.73 ± 7.63 points. Semantic fluency score (animals in 1 minute) also ranged widely, from 1 to 21. All patients had some degree of executive dysfunction, regardless of the syndrome diagnosed before assessment.

Language impairment was found at the first neuropsychological assessment in all but 1 patient. Four patients diagnosed with PNFA at the evaluation showed a nonfluent, effortful, and hesitant speech. Phonemic paraphasias were found in 3 of them, and echolalia in 2. The main signs seen in patients not diagnosed with PNFA at the first neuropsychological

evaluation were mild anomia or a decreased speech output consistent with dynamic aphasia.

Four patients showed episodic memory dysfunction of the frontal type, characterized by impaired encoding and retrieval significantly benefiting from semantic cueing. Two patients had episodic memory impairment of the hippocampal type, with impaired storage, and did not therefore benefit from semantic cueing. Two patients had memory dysfunction with impaired retrieval. Finally, 2 additional patients had no memory impairment on the first assessment, and memory was not evaluable in the remaining patient. These data are summarized in table 3.

Nine patients (81.8%) showed signs of parietal lobe dysfunction including ideomotor apraxia, constructive apraxia, dysgraphia, dyscalculia, or hemineglect. These signs of parietal dysfunction were more evident in patients with a diagnosis of CBS at neuropsychological assessment. Parietal dysfunction was also more marked in patients with a longer disease course at the time of assessment. These data are summarized in table 4.

DISCUSSION Our study reports the clinical and neuropsychological findings in a relatively large number of patients with the c.709-1G>A mutation in the *PGRN* gene. So far, this mutation has only been reported in people of a Basque descent. This

Table 3 Neuropsychological features

Case	Time to assessment, y	Diagnosis at assessment	MMSE	Semantic fluency	FAB	Executive dysfunction	Memory impairment	Language and speech disorders
1	2.5	AD-CBS	14	3	5	+++	Frontal type	Decreased speech output
2	3	Gerstmann syndrome-AD	24	8	-	++	Hippocampal type	Mild anomia and dysgraphia
4	1	bvFTD	25	14	18	+	Hippocampal type	Normal
5	1	bvFTD-PNFA	23	10	15	+	Impaired retrieval	Nonfluent, anomia, hesitant, phonemic paraphasias, and dysgraphia
8	1	PNFA-CBS	18	7	-	+	Frontal type	Stuttering, effortful, phonemic paraphasias, and anomia
10	0.5	bvFTD	27	16	11	++	No impairment	Anomia and decreased speech output
11	1	bvFTD	29	21	18	++	Impaired retrieval	Mild anomia
12	0.5	bvFTD	24	7	12	++	No impairment	Mild anomia
14	3.5	bvFTD	19	5	6	+++	Frontal type	Anomia
15	1.5	PNFA	5	1	3	++	Frontal type	Nonfluent, anomia, phonemic paraphasias, echolalia, sentence comprehension, impaired repetition, and dysgraphia
18	2.5	PNFA	9	1	-	++	Not evaluable	Nonfluent, anomia, echolalia and palilalia, and dysgraphia

MMSE = Mini-Mental State Examination; FAB = Frontal Assessment Battery; AD = Alzheimer disease; CBS = corticobasal syndrome; bvFTD = behavioral variant frontotemporal dementia; PNFA = progressive nonfluent aphasia; + = mild; ++ = moderate; +++ = severe.

mutation leads to decay of mutant mRNA resulting in progranulin haploinsufficiency.¹⁰ As in other series, significant variability was found in age at onset, clinical presentation, and neuropsychological features. Estimated age-related disease penetrance showed a lower proportion of carriers of the c.709-1G>A mutation to be affected at 60 years as compared to previously estimated liability curves.^{3,7} This difference may be accounted for by an actual delay in age at disease onset in our c.709-1G>A mutation

carriers. However, potential biases should be considered, as not all at-risk individuals were included in these analyses and no other adjustments for potential confounders were performed. The 82-year-old asymptomatic carrier with mild and stable frontal dysfunction raises interesting questions about progranulin deficit, age, and neurodegeneration. Few studies have examined cognitive dysfunction of patients with *PGRN* mutations in preclinical stages. A subtle impairment in processing of conflicting infor-

Table 4 Parietal lobe features at first neuropsychological evaluation of 11 PGRN mutation carriers

Case	Time to assessment, y	Diagnosis at assessment	Right ideomotor praxis (BT)	Left ideomotor praxis (BT)	Bilateral manual praxis (BT)	Constructional graphic apraxia (CERAD)	Dysgraphia	Dyscalculia	Hemineglect
1	2.5	AD-CBS	8/10	5/10	2/8	0/11	Yes (not specified)	0/5	Yes (L)
2	3	Gerstmann syndrome-AD	9/10	10/10	6/8	7/11	Yes (graphemic buffer impairment)	0/5	No
4	1	bvFTD	10/10	10/10	8/8	9/11	No dysgraphia	3/5	No
5	1	bvFTD-PNFA	10/10	10/10	6/8	11/11	Yes (omission of graphemes)	4/5	No
8	1	PNFA-CBS	10/10	6/10	6/8	10/11	No dysgraphia	1/5	Yes (L)
10	0.5	bvFTD	10/10	10/10	6/8	11/11	No dysgraphia	2/5	No
11	1	bvFTD	10/10	10/10	8/8	11/11	No dysgraphia	5/5	No
12	0.5	bvFTD	10/10	10/10	8/8	7/11	No dysgraphia	3/5	No
14	3.5	bvFTD	8/10	10/10	6/8	11/11	No dysgraphia	2/5	No
15	1.5	PNFA	6/10	6/10	5/8	4/11	Yes (not specified)	0/5	No
18	2.5	PNFA	5/10	3/10	4/8	Yes	Yes (omission of graphemes)	1/5	No

BT = Barcelona test; CERAD = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; AD = Alzheimer disease; CBS = corticobasal syndrome; bvFTD = behavioral variant frontotemporal dementia; PNFA = progressive nonfluent aphasia.

mation and inhibiting responses on a task of executive control over attention in preclinical *PGRN* mutation carriers has been reported.²²

The clinical syndromes diagnosed in our series usually belonged to the clinical spectrum of FTD (bvFTD, PNFA, CBS), although a diagnosis of probable AD was made in 14% of patients. Episodic memory disorders were found in 72.7% of patients undergoing a detailed neuropsychological assessment, and in 18.2% such memory impairment was consistent with a hippocampal amnesic syndrome that mimicked AD. These figures are similar to those found in other *PGRN* mutation carriers.^{9,23} Le Ber et al.⁹ hypothesized that the amnesic syndrome in *PGRN* mutation carriers is related to hippocampal neurodegeneration caused by progranulin-related disease, but pathologic confirmation was lacking. Hippocampal sclerosis was detected in 83% of *PGRN* mutation carriers, but severity of hippocampal degeneration did not differ between *PGRN*(+) and *PGRN*(-) patients.²⁴ Language dysfunction is also a prominent presenting symptom in a subset of *PGRN* mutation carriers,^{3,7-12} and language disorders emerge later in most patients.^{5,7,9,12} Although characteristics of aphasia in our series differ, the most common presentations are those of a PNFA, mild anomia, or a decreased speech output without other language features, consistent with dynamic aphasia. These patterns have also been reported in other series.^{8,9} No patient had MND, but a clinical diagnosis of MND and FTD-MND were made in the relatives of 2 patients in our series.

Among behavioral symptoms, and in agreement with other studies, apathy was most prominent, followed by impulsivity, disinhibition, bulimia, or compulsive eating, suggesting involvement of the medial frontal and orbitofrontal cortex. Only one patient with the mutation developed visual hallucinations at disease onset. In other studies, the proportion of patients with psychotic symptoms was relatively high (25%), and has even been considered a feature that may differentiate patients with *PGRN* mutations from other patients with FTD.⁹

At the first neuropsychological assessment, most patients had some sign of frontal dysfunction (100% with executive impairment, 36.4% with memory impairment of the frontal type), temporal dysfunction (18.2% with episodic memory disorders of the hippocampal type), and parietal dysfunction (81.8% with some signs of parietal dysfunction). In addition, the signs and symptoms were progressive, and a secondary diagnosis was made in 61.9% of these patients within 2 years since the onset of disease. Both the extensive cognitive dysfunction and the relatively rapid progression caused patients not to meet the

proposed standard diagnostic criteria.²⁵⁻²⁷ We therefore considered more helpful the operationalized criteria for clinical use¹⁵ used here, which cause some discrepancies with previously published diagnoses in our series.¹⁰

The phenotype of the disease may not be as heterogeneous as suggested, because although initial deficits may lead to different primary clinical diagnoses, when a detailed neuropsychological assessment was available, some degree of frontal, temporal, and parietal involvement was found in almost all patients. Accordingly, in a pathologic study comparing *PGRN*(+)-FTD vs *PGRN*(-)-FTD cases, the former group had significantly more generalized atrophy and smaller brains at autopsy. It is hypothesized that the mutation results in a more malignant form of FTLD.²⁴

This study provides a confirmation of the occurrence of parietal lobe dysfunction in carriers of the c.709-1G>A mutation. Parietal lobe dysfunction may typically occur with some of the following symptoms: dysgraphia, dyscalculia, visuospatial dysfunction, limb apraxia, constructional apraxia, and visual or sensory hemineglect, which are uncommonly found in patients with FTD. Some previous studies have compared the clinical features of patients with *PGRN*(+)-FTD and *PGRN*(-)-FTD.^{8,9,11} These studies agree to establish the existence of some sign of parietal involvement in *PGRN* mutation carriers, which has also been confirmed in a large British kindred with the C31LfsX35 mutation in *PGRN*.²⁸ Moreover, parietal lobe deficits and histopathologic evidence of parietal lobe involvement have previously been reported in families with different *PGRN* mutations.^{4,29,30}

Neuroimaging studies have also confirmed parietal atrophy in *PGRN* mutation carriers. One study compared *PGRN*(+) patients with a *PGRN*(-) group matched by clinical diagnosis using voxel-based morphometry and found that *PGRN*(+) patients showed greater gray matter loss in the frontal and parietal lobes.³¹ Other studies have also confirmed parietal atrophy in *PGRN*(+) patients on neuroimaging.^{4,8,28,32,33} Accordingly, parietal lobe atrophy tended to be more marked at autopsy in *PGRN* carriers as compared to FTLD-U patients without *PGRN* mutations.²⁴

Parietal lobe dysfunction is a well-recognized feature of CBS.²⁷ In our series, 47.6% of patients showed features leading to diagnosis of the CBS at some point during the clinical course. In other large series of *PGRN*(+)-FTD patients, less than 10% had CBS.^{3,7,9,11} Parietal lobe dysfunction is therefore supported in our series by the high proportion of patients with CBS as a secondary or tertiary diagnosis.

The clinical presentation referred to as CBS is not always predictive of typical corticobasal degeneration (CBD) pathology.^{14,27,34,35} Previously reported patients with *PGRN* mutations have been associated with the clinical presentation of primary CBS.^{3,7,32,33,36} Other *PGRN* mutations have been reported in patients with CBS as a secondary clinical diagnosis.^{8,12,28,30} Limb apraxia or alien limb phenomenon have been observed in an advanced stage of the disease course in additional subjects with FTL-D-U carrying a *PGRN* mutation.^{4,24,37}

The high proportion of cases affected by secondary or tertiary CBS in our series may correspond to the specific phenotypic expression of the c.709-1G>A mutation. This is unlikely given the haploinsufficiency model proposed for most *PGRN* mutations. Alternatively, the disease may occur with a specific phenotype in the Basque population due to additional genetic or environmental factors.

Despite the high frequency of CBS in the series, no primary diagnosis of CBS was made in our patients. This finding may suggest a delayed involvement of the parietal lobe and may be interpreted by assuming that the pathology spreads from frontal and temporal lobes to parietal lobes in a topographically predictable sequence, similar to what has been proposed for other neurodegenerative diseases.^{38,39} Supporting this hypothesis, patients with *PGRN*(+)-FTLD-U have moderate to marked parietal lobe degeneration more commonly than patients with *PGRN*(-)-FTLD-U (50% vs 17%), and parietal degeneration was never detected alone, but always associated with degeneration in the frontal or temporal lobe.²⁴

Our study has a number of limitations. First, histopathologic correlation is not available because most patients are still alive. Only 2 autopsy studies, insufficient to draw conclusions, have been performed. These autopsy studies showed the typical findings of frontotemporal lobar degeneration with tau-negative and ubiquitin-positive neuronal inclusions (FTLD-U). Second, clinical and neuropsychological assessments and follow-up were not systematically standardized. Evaluations performed in patients with different clinical syndromes and at different times since disease onset are difficult to compare. Third, behavioral symptoms assessment did not rely on specific structured questionnaires. Also, examiners and participants were not always blinded for genetic status, which could influence interpretation of specific symptoms.

Patients with the c.709-1G>A mutation in *PGRN* exhibit a variable phenotype as regards both age at onset and initial symptoms. It is important to characterize the phenotype of patients with FTD

with *PGRN* gene mutations in order to determine the full clinical spectrum in mutation carriers and their differences from other patients with FTD, which could indicate different underlying pathogenetic mechanisms.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the patients and families who participated in the study.

DISCLOSURE

Dr. Moreno, Dr. Indakoetxea, Dr. Barandiaran, Dr. Alzualde, Dr. Gabilondo, and Dr. Estanga report no disclosures. Dr. Ruiz is a predoctoral fellow with funding from the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Dr. Ruibal, Dr. Bergareche, and Dr. Martí-Massó report no disclosures. Dr. López de Munain is a PhD with funding from the Instituto de Salud Carlos III.

Received May 10, 2009. Accepted in final form July 29, 2009.

REFERENCES

1. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006;442:916–919.
2. Cruts M, Gijssels I, van der Zee J, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006;442:920–924.
3. Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, et al. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet* 2006;15:2988–3001.
4. Snowden JS, Pickering-Brown SM, Mackenzie IR, et al. Progranulin gene mutations associated with frontotemporal dementia and progressive non-fluent aphasia. *Brain* 2006;129:3091–3102.
5. Bruni AC, Momeni P, Bernardi L, et al. Heterogeneity within a large kindred with frontotemporal dementia: a novel progranulin mutation. *Neurology* 2007;69:140–147.
6. Mesulam M, Johnson N, Krefft TA, et al. Progranulin mutations in primary progressive aphasia. *Arch Neurol* 2007;64:43–47.
7. Rademackers R, Baker M, Gass J, et al. Phenotypic variability associated with progranulin haploinsufficiency in patients with the common 1477→T (Arg493X) mutation: an international initiative. *Lancet Neurol* 2007;6:857–868.
8. Beck J, Rohrer JD, Campbell T, et al. A distinct clinical, neuropsychological and radiological phenotype is associated with progranulin gene mutations in a large UK series. *Brain* 2008;131:706–720.
9. Le Ber I, Camuzat A, Hannequin D, et al. Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study. *Brain* 2008;131:732–746.
10. López de Munain A, Alzualde A, Gorostidi A, et al. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol Psychiatry* 2008;63:946–952.
11. Pickering-Brown SM, Rollinson S, Du Plessis D, et al. Frequency and clinical characteristics of progranulin mutation carriers in the Manchester frontotemporal lobar de-

- generation cohort: comparison with patients with MAPT and no known mutations. *Brain* 2008;131:721–731.
12. Kelley BJ, Haidar W, Boeve BF, et al. Prominent phenotypic variability associated with mutations in progranulin. *Neurobiol Aging* 2009;30:739–751.
 13. Bertranpetit J, Cavalli-Sforza LL. A genetic reconstruction of the history of the population in the Iberian Peninsula. *Ann Hum Genet* 1991;55:51–67.
 14. Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Muñoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain* 2005;128:1996–2005.
 15. Knopman D, Boeve B, Caselli R, et al. Longitudinal tracking of FTL: toward developing clinical trial methodology. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2007;21:S58–S63.
 16. Folstein MF, Folstein S, McHugh PR. “Mini-mental state”: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189–198.
 17. Morris JC, Mohs RC, Rogers H, Fillenbaum G, Heyman A. CERAD: clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer’s disease. *Psychopharmacol Bull* 1988;24:641–652.
 18. Goodglass H, Kaplan E. Boston Diagnostic Aphasia Examination (BDAE). Philadelphia: Lea & Febiger; distributed by Psychological Assessment Resources, Odessa, FL; 1983.
 19. Peña-Casanova J. Programa Integrado de Exploración Neuropsicológica: Test Barcelona. Barcelona: Masson; 1990.
 20. Benton A, Hamsher K. Multilingual aphasia examination. Iowa City: University of Iowa; 1978.
 21. Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: a frontal assessment battery at bedside. *Neurology* 2000;55:1621–1626.
 22. Hallam BJ, Jacova C, LaMarre A, et al. Executive control of attention in presymptomatic progranulin-mutation carriers. Presented at the 6th International Conference on Frontotemporal Dementias; September 5, 2008; Rotterdam, the Netherlands.
 23. Van Swieten JC, Heutink P. Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2008;7:965–974.
 24. Josephs KA, Ahmed Z, Katsuse O, et al. Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with progranulin gene (PGRN) mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:142–151.
 25. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998;51:1546–1554.
 26. Mesulam MM. Primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2001;49:425–432.
 27. Boeve BF, Lang AE, Litvan I. Corticobasal degeneration and its relationship to progressive supranuclear palsy and frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2003;54(suppl 5):S15–S19.
 28. Rohrer JD, Warren JD, Omar R, et al. Parietal lobe deficits in frontotemporal lobar degeneration caused by a mutation in the progranulin gene. *Arch Neurol* 2008;65:506–513.
 29. Lendon CL, Lynch T, Norton J, et al. Hereditary dysphasic disinhibition dementia: a frontotemporal dementia linked to 17q21-22. *Neurology* 1998;50:1546–1555.
 30. Mackenzie IR, Baker M, West G, et al. A family with tau-negative frontotemporal dementia and neuronal intranuclear inclusions linked to chromosome 17. *Brain* 2006;129:853–867.
 31. Whitwell JL, Jack CR, Baker M, et al. Voxel-based morphometry in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with and without progranulin mutations. *Arch Neurol* 2007;64:371–376.
 32. Masellis M, Momeni P, Meschino W, et al. Novel splicing mutation in the progranulin gene causing familial corticobasal syndrome. *Brain* 2006;129:3115–3123.
 33. Spina S, Murrell JR, Huey ED, et al. Corticobasal syndrome associated with the A9D progranulin mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:892–900.
 34. Schneider JA, Watts RL, Gearing M, Brewer RP, Mirra SS. Corticobasal degeneration: neuropathologic and clinical heterogeneity. *Neurology* 1997;48:959–969.
 35. Boeve BF, Maraganore DM, Parisi JE, et al. Pathologic heterogeneity in clinically diagnosed corticobasal degeneration. *Neurology* 1999;53:795–800.
 36. Benussi L, Binetti G, Sina E, et al. A novel deletion in progranulin gene is associated with FTDP-17 and CBS. *Neurobiol Aging* 2008;29:427–435.
 37. Spina S, Murrell JR, Huey ED, et al. Clinicopathologic features of frontotemporal dementia with progranulin sequence variation. *Neurology* 2007;68:820–827.
 38. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239–259.
 39. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson’s disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197–211.

Be Recognized: Apply for a 2010 AAN Award

The deadline to apply for most awards is November 2, 2009. Visit www.aan.com/2010awards to find an award in your subspecialty. Researchers, residents, students, and more are invited to apply—awards are open to non-AAN members. Be recognized for your work at the Awards Luncheon held at the 2010 Annual Meeting alongside some of the best and brightest in neurology. November 2 is also the deadline to submit scientific abstracts for the 2010 Annual Meeting. Learn more at www.aan.com/abstracts.

Prion Protein Codon 129 Polymorphism Modifies Age at Onset of Frontotemporal Dementia With the C.709-1G>A Progranulin Mutation

Fermin Moreno, MD,*† Ainhoa Alzualde, PhD,‡ § Pablo Martínez Camblor, PhD,§||
Myriam Barandiaran, MD,*† Vivianna M. Van Deerlin, MD, PhD,¶ Alazne Gabilondo, MD,*†
José F. Martí Massó, MD, PhD,*† Adolfo López de Munain, MD, PhD,*†
and Begoña Indakoetxea, MD*†

Abstract: Frontotemporal lobar degeneration because of mutations in the progranulin (PGRN) gene presents a high variability both in the clinical phenotype and age of onset of disease. Factors that influence this variability remain largely unknown. The aim of our study was to determine whether selected genetic variables modify age at onset of disease in our series of 21 patients with a single splicing mutation (c.709-1G>A) in the PGRN gene, all of whom were of Basque descent. In our analysis, we included the following genetic variables: PGRN rs5848 and rs9897526 polymorphisms, APOE and microtubule-associated protein tau genotypes, and PRNP codon 129 polymorphism. We found no association between PGRN polymorphisms, APOE and microtubule-associated protein tau genotypes, and age at onset of the disease; whereas we report evidence for an association between PRNP codon 129 polymorphism and age at onset of disease in frontotemporal dementia-PGRN(+) patients. MM homozygous carriers presented onset of disease on average 8.5 years earlier than patients who carried at least 1 valine on their PRNP codon 129 (MV or VV). The biological justification for this association remains speculative.

Key Words: APOE, PRNP codon 129, frontotemporal dementia, frontotemporal lobar degeneration, progranulin, prion protein gene

(*Alzheimer Dis Assoc Disord* 2011;25:93–95)

Progranulin (PGRN) gene mutations are a frequent genetic cause of frontotemporal lobar degeneration. Despite the suggested common pathogenic mechanism of

haploinsufficiency for all the PGRN mutations, there is a huge variability both in age at onset and initial symptoms of disease.

Genetic or environmental factors that influence the phenotypic variability and the age at onset remain unknown. Of the genetic factors studied, the haplotype of microtubule-associated protein tau (MAPT) seems to have no effect on the age at onset,^{1,2} although 1 recent study has shown that H1H2 subjects carrying the Leu271LeufsX10 mutation in PGRN had an earlier disease onset than H2H2 individuals.³ The presence of at least 1 APOE ε4 allele has been associated with a delay in onset in some studies,^{1,4} but not in others.² One international study found that patients with the Arg493X mutation that carried the A-allele at rs9897526, a polymorphism on their wild-type PGRN allele, have delayed symptom onset.² Although homozygosity for the T-allele at rs5848 could act as a risk factor for frontotemporal dementia (FTD), no effect of this common genetic variant as a modifier factor in PGRN mutation carriers has been proved.²

Our group identified the c.709-1G>A (Ala237Trpfsx4) mutation in the PGRN gene in patients with FTD.^{5,6} The objective of this study was to determine the potential role of some selected genetic factors in the age at onset of the disease in our series of patients with this single splicing mutation in PGRN. We included PRNP codon 129 analysis in our study because this polymorphism has been suggested as a possible disease-modifying factor in various neurodegenerative diseases.

METHODS

Study Population

Patients were recruited from the “Cognitive Disorders Unit” at Donostia Hospital, a tertiary referral center. We included patients with the c.709-1G>A mutation in PGRN. All patients were diagnosed with a FTD complex syndrome and were of Basque origin. The clinical and neuropsychologic features of the series have been published earlier.^{5,6} We considered age at onset as being when principal caregivers reported having observed the first symptoms of disease in a detailed interview.

Genotyping

DNA was extracted from blood cells by standard procedures after written informed consent was obtained from patients or relatives. PGRN gene sequencing procedures

Received for publication December 16, 2009; accepted January 14, 2010.

From the *Department of Neurology, Hospital Donostia; †Neurogenetics Research Unit, Ilundain Fundazioa-Instituto Biodonostia; ‡Public Health Department of Gipuzkoa, Basque Government, San Sebastian, Gipuzkoa; §Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED); §Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain; and ¶Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania Health System, Philadelphia, PA.

Supported by Ilundain Fundazioa, the Provincial government of Gipuzkoa (Ref. 76/08), and the Basque Government (SAIOTEK program). Adolfo Lopez de Munain receives research funding from the Instituto de Salud Carlos III.

Fermin Moreno and Ainhoa Alzualde contributed equally to this study. Reprints: Fermin Moreno, MD, Department of Neurology, Hospital Donostia, Paseo Dr Begiristain sn, CP 20014, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain (e-mail: FERMIN.MORENOIZCO@osakidetza.net; larriola@euskalnet.net).

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins

used in our laboratory have been published elsewhere.⁵ APOE and MAPT genotypes were analyzed as described in Blazquez et al⁷ and Baker et al,⁸ respectively. To analyze the PRNP 129 codon position, a fragment of 385 bp of PRNP was amplified using primers designed by us (PRNP Forward 5'-GCCAAAAACCAACATGAAGC-3' and PRNP Reverse primer 5'-CATGCTCGATCCTCTCTGG-3'). The fragment obtained was digested by BsaAI endonuclease which cuts if there is a valine at codon 129.

Statistical Analysis

Categorical variables are described by absolute and relative frequencies and compared with the χ^2 test. The Pearson correlation coefficient was used to study the linear association between continuous variables, and, for each group considered, the normal distribution of such variables was checked using the Shapiro-Wilks test. Analysis of variance test, or the Welch test as required, was used to analyze mean equalities. The Kernel density estimator was used to estimate the probability function. *P* values lower than 0.05 were considered significant. Statistical analysis was performed using R statistical software, version R 2.6.1.

RESULTS

Twenty-one patients with the c.709-1G>A mutation from 13 families were included in the genetic analysis. Fourteen were women and 7 men and their age at onset of disease ranged from 42 to 70 years (mean \pm SD = 59.2 \pm 7.2 y). This variable showed a fairly symmetrical distribution with a median of 61 years. No significant difference was found in the age at onset between men and women (men 57.4 \pm 6.8 y vs. women 60.1 \pm 7.5 y, *P* = 0.432) or between different initial diagnostic groups (*P* = 0.22).

The distribution of the studied polymorphisms and haplotypes is summarized in Table 1. Age at onset of dementia was not associated with the rs5848 (*P* = 0.591) or the rs9897526 (*P* = 0.654) polymorphisms of the PGRN gene; neither was age at onset affected by MAPT genotype nor APOE status when we compared the group that carried at

least 1 APOE ϵ 4 allele with other APOE variants (APOE ϵ 4 carriers, 61 \pm 7.4 y vs. APOE ϵ 4 noncarriers, 59.9 \pm 6.2 y, *P* = 0.756).

Analyses with the analysis of variance test showed significant differences among the 3 groups of patients classified according to their PRNP codon 129 status (MM, MV, and VV, *P* = 0.043). Specifically, the MV and VV groups were comparable regarding age at onset of disease (MV 61.7 \pm 6.28 y vs. VV 61.7 \pm 5.85 y). Given these results, we compared the group of patients who had at least 1 valine on their PRNP codon 129 (MV and VV) with the MM group. The MM homozygous patients, on average, were found to present 8.5 years earlier than patients who carried at least 1 valine on their PRNP codon 129 (MM 53.2 \pm 7.11 y vs. MV-VV 61.7 \pm 5.9 y, *P* = 0.011) (Fig. 1).

DISCUSSION

Clinical descriptions of FTD-PGRN(+) patients show significant variability in the age at onset of the disease. Our study included patients with a single mutation in the PGRN gene (c.709-1G>A) and all patients were of Basque descent, with a homogeneous genetic background.

In this article, we report the influence of the PRNP codon 129 status on the age at onset of FTD because of PGRN haploinsufficiency. We observed an earlier age at onset of the disease for the PRNP codon 129 MM homozygous group. No significant differences were found between PRNP codon 129 distribution in our patients and in a sample of 119 Basque healthy subjects (MM: 40.3%, MV: 47.1%, and VV: 12.6%, *P* > 0.05, data not published). The pathogenic mechanism that connects this polymorphism and some degenerative diseases like Alzheimer disease or primary progressive aphasia may reflect a general response to cellular stress rather than specific cooperation in aggregation of other proteins.⁹

The function of the cellular prion protein is uncertain, although it has been implicated in several potential functions, including intracellular transport of copper, cellular resistance to oxidative stress, or normal synaptic functioning.

TABLE 1. Distribution of Genotypes Analyzed, Diagnostic Groups, and Age at Onset of the Disease

Analyzed Variables	Genotype	N	Age at Onset (Mean \pm SD) (y)
rs5848	CT	9	58.2 \pm 6.2
	CC	12	60 \pm 8.1
rs9897526	GG	19	59 \pm 7.5
	GA	2	61.5 \pm 6.4
APOE	ϵ 2 ϵ 3	1	70
	ϵ 3 ϵ 3	15	59.3 \pm 5.7
	ϵ 3 ϵ 4	4	61 \pm 7.4
MAPT	H1H1	9	56.9 \pm 8.3
	H1H2	11	60.3 \pm 5.6
	H2H2	1	70
PRNP 129	MM	6	53.2 \pm 7.1
	MV	9	61.7 \pm 6.3
	VV	6	61.7 \pm 5.8
Initial diagnosis	bvFTD	11	57 \pm 7.51
	PNFA	5	62.8 \pm 6.72
	AD	3	64 \pm 5.19
	PD	1	60
	Gerstmann syndrome	1	52

AD indicates Alzheimer disease; bvFTD, behavioral variant frontotemporal dementia; MAPT, microtubule-associated protein tau; PD, Parkinson disease; PNFA, progressive nonfluent aphasia.

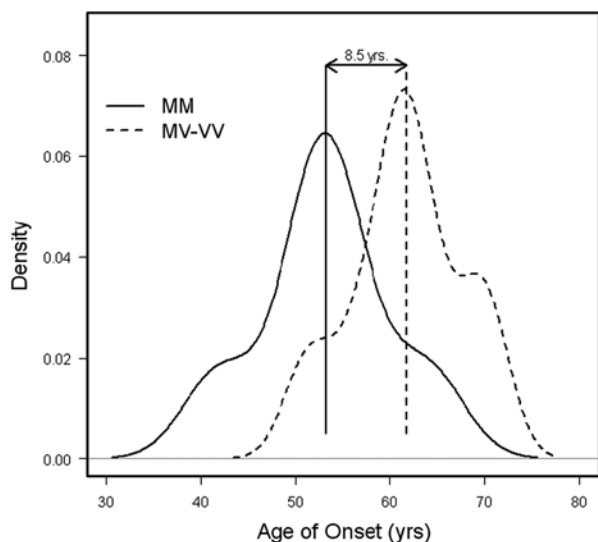


FIGURE 1. Distribution of age at onset of PRNP codon 129 MM homozygous cases compared with MV and VV groups. Age at onset density curves show that MM homozygous patients at codon 129 of PRNP presented on average 8.5 years earlier than patients who carried at least 1 valine on their PRNP codon 129. Both curves show a fairly symmetrical and normal distribution.

A relationship between TAR-DNA binding protein-43, the main constituent of frontotemporal lobar degeneration-PGRN(+) associated ubiquitin-positive inclusions, and prion protein aggregates in human prion diseases has not been shown.¹⁰

Our study has a number of limitations; one of them is the small sample size. Although our sample is relatively large, taking into account the prevalence of the disease and the inclusion of only patients carrying a single mutation in PGRN, it could be argued that it is too small to establish statistically robust differences. However, the estimated statistical power of our study is 0.763, close to the usually recommended 0.8 value in most study designs. We tried to replicate our finding in a sample of 54 patients with a clinical diagnosis of FTD, but we did not find significant influence of codon 129 polymorphism on the age at onset of disease (data not shown). These results are not surprising as this is a heterogeneous sample based on clinical diagnosis. Codon 129 PRNP influence could be undermined by the

stronger influence of other genetic or environmental factors in a group of patients with probably different subjacent pathologic diseases.

Our findings warrant further replication in larger FTD-PGRN(+) series to avoid any spurious associations. An international effort should be encouraged to bring together patients into international cooperative studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Pascual Sánchez Juan and Larraitz Arriola for critical reading of the manuscript and Dr Ana Belén Rodríguez-Martínez for PRNP distribution data. They are grateful for the generous contribution of the patients and families who took part in the study.

REFERENCES

- Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, et al. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2988–3001.
- Rademakers R, Baker M, Gass J, et al. Phenotypic variability associated with progranulin haploinsufficiency in patients with the common 1477C→T (Arg493X) mutation: an international initiative. *Lancet Neurol.* 2007;6:857–868.
- Benussi L, Ghidoni R, Pegoiani E, et al. Progranulin Leu271-LeufsX10 is one of the most common FTLD and CBS associated mutations worldwide. *Neurobiol Dis.* 2009;33:379–385.
- Beck J, Rohrer JD, Campbell T, et al. A distinct clinical, neuropsychological and radiological phenotype is associated with progranulin gene mutations in a large UK series. *Brain.* 2008;131:706–720.
- López de Munain A, Alzualde A, Gorostidi A, et al. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol Psychiatry.* 2008;63:946–952.
- Moreno F, Indakoetxea B, Barandiaran M, et al. “Frontotemporoparietal” dementia. Clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology.* 2009;73:1367–1374.
- Blazquez L, Otaegui D, Saenz A, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele in familial and sporadic Parkinson’s disease. *Neurosci Lett.* 2006;406:235–239.
- Baker M, Litvan I, Houlden H, et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.* 1999;8:711–715.
- Kovacs GG, Zerbi P, Voigtländer T, et al. The prion protein in human neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett.* 2002;329:269–272.
- Isaacs AM, Powell C, Webb TE, et al. Lack of TAR-DNA binding protein-43 (TDP-43) pathology in human prion diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34:446–456.

BRIEF COMMUNICATION

Neuropsychological Features of Asymptomatic c.709-1G>A Progranulin Mutation Carriers*

Myriam Barandiaran,^{1,2,3} Ainara Estanga,^{2,3,4} Fermín Moreno,^{1,2,3,4} Begoña Indakoetxea,^{1,2,3,4}
Ainhoa Alzualde,^{2,3,4} Nekane Balluerka,⁵ José Félix Martí Massó,^{1,2,3,4} AND Adolfo López de Munain^{1,2,3,4}

¹Department of Neurology, Hospital Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, Spain

²Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, area 6), Gipuzkoa, Spain

³Neurogenetics Research Unit, Ilundain Fundazioa, Gipuzkoa, Spain

⁴Neurosciences Area, Institute Biodonostia, San Sebastián, Gipuzkoa, Spain

⁵Department of Social Psychology and Methodology of Behavioral Sciences, University of the Basque Country, San Sebastián, Spain

(RECEIVED September 23, 2011; FINAL REVISION May 16, 2012; ACCEPTED May 16, 2012)

Abstract

Mutations in the progranulin (PGRN) gene have been identified as a cause of frontotemporal dementia (FTD). However, little is known about the neuropsychological abilities of asymptomatic carriers of these mutations. The aim of the study was to assess cognitive functioning in asymptomatic c.709-1G>A PGRN mutation carriers. We hypothesized that poorer neuropsychological performance could be present before the development of clinically significant FTD symptoms. Thirty-two asymptomatic first-degree relatives of FTD patients carrying the c.709-1G>A mutation served as study participants, including 13 PGRN mutation carriers (A-PGRN+) and 19 non-carriers (PGRN-). A neuropsychological battery was administered. We found that the A-PGRN+ participants obtained significantly poorer scores than PGRN- individuals on tests of attention (Trail-Making Test Part A), mental flexibility (Trail-Making Test Part B), and language (Boston Naming Test). Poorer performance on these tests in asymptomatic PGRN mutation carriers may reflect a prodromal phase preceding the onset of clinically significant symptoms of FTD. (*JINS*, 2012, 18, 1086–1090)

Keywords: Frontotemporal dementia, Cognition, Executive function, Attention, Primary progressive aphasia, Early diagnosis

INTRODUCTION

Frontotemporal dementia (FTD) refers to a group of neurodegenerative disorders comprising three canonical clinical presentations: behavioral variant FTD, semantic dementia, and progressive non-fluent aphasia. These clinical symptoms may share features with motor neuron disease, corticobasal syndrome and/or progressive supranuclear palsy. Frontotemporal lobe degeneration (FTLD) is the anatomical descriptive term denoting the relatively selective atrophy of frontal and temporal lobe that characterizes most FTD cases

(Rhorer & Warren 2011). Mutations in the progranulin gene (PGRN; MIM 128945) have been identified as a major cause of FTLD with ubiquitin-positive, tau-negative inclusions (FTLD-U; Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006). Subsequent research has identified more than 65 pathogenic point mutations and some deletions in the PGRN gene associated with FTD (www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations). All PGRN mutations identified thus far appear to cause disease by reducing the amount of available functional PGRN progranulin. Progranulin deficiency, or haploinsufficiency, seems to be a lifelong condition and recent studies have shown that levels of the progranulin protein are below average in plasma and in cerebrospinal fluid in all carriers of PGRN mutations, regardless of whether they are affected by FTD (Ghidoni, Benussi, Glionna, Franzoni, & Binetti, 2008).

Studies of asymptomatic carriers of PGRN, microtubule-associated protein tau (MAPT) and other FTLD-related mutations may assist in identifying potential neuropsychological deficits which could reflect an elevated risk for FTD

*Authors' Disclosure and Study Funding: This work was supported by Diputación Foral de Gipuzkoa (dossier 76/08) and the Basque Government (SAIOTEK program). Dr. López de Munain is a PhD with funding from the Instituto de Salud Carlos III. Authors report no disclosures.

Correspondence and reprint requests to: Myriam Barandiaran, Department of Neurology, Hospital Donostia, Paseo Dr Begiristain sn, CP 20014, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain. E-mail: myriam.barandiaranamillano@osakidetza.net

or a prodromal stage of the disease. These studies are essential for targeting early intervention strategies to those at the greatest risk. Previous studies have identified deficits in frontal-executive and attentional functioning in asymptomatic MAPT mutation carriers (Geschwind et al., 2001). However, little is known about cognitive functioning in asymptomatic PGRN mutation carriers.

Our group identified the c.709-1G>A (Ala237Trpfsx4) mutation in the PGRN gene in patients with FTD, with a high proportion of cases developing corticobasal syndrome as the disease progressed (López de Munain et al., 2008; Moreno et al., 2009). The age at disease onset ranged from 42 to 71 years (mean age, 59.2 ± 7.2 years), and the clinical and neuropsychological phenotypes were heterogeneous. Behavioral variant frontotemporal dementia (52.4%) and progressive non-fluent aphasia (23.8%) were the most common clinical syndromes. At the first neuropsychological evaluation, executive dysfunction was present in all the patients and language impairment was the second most common feature (López de Munain et al., 2008). As the disease progressed, symptoms consistent with parietal lobe damage were evident and corticobasal syndrome was a frequent (64.3%) secondary diagnosis (Moreno et al., 2009).

The objective of this study was to assess neuropsychological functioning in asymptomatic c.709-1G>A PGRN mutation carriers compared to non-carrier relatives. We hypothesized that neuropsychological deficits could be present before the development of clinically significant symptoms and could reflect a prodromal stage in the development of FTD.

METHODS

Study Population and Design

Twenty-three patients with frontotemporal dementia (FTD) carrying the c.709-1G>A mutation in PGRN were identified between 1995 and 2008 in Donostia Hospital, a tertiary referral center. First-degree relatives of these patients were invited to participate in a prospective longitudinal study to investigate early neuropsychological features of the disease. Exclusion criteria were: (i) history of neurological illness (cerebrovascular disease or any other neurological disease) or major psychiatric illness (schizophrenia, major depression, and bipolar disorder), (ii) use of drugs or toxic agents that could interfere with cognitive function, and (iii) estimated Global IQ score <85 (abbreviated WAIS-III). Subjects were interviewed by an experienced clinician and no recent changes in cognitive function or behavior were detected.

Thirty-two individuals from five families met inclusion and exclusion criteria and served as study participants. The participants were divided in two groups: asymptomatic PGRN mutation carriers (A-PGRN+; $n = 13$) and non-carrier relatives (PGRN-; $n = 19$). There were no significant differences between groups in age, education, estimated IQ, or gender (Table 1).

Molecular Procedures

DNA was extracted from blood cells using standard procedures. The c.709-1G>A nucleotide position was genotyped by PCR-RFLP: a fragment of 373 bp was amplified using primers GRN 7F and GRN 7R as described previously (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006), and this was followed by restriction enzyme digestion, using *Hae*III (New England Biolabs, USA).

Neuropsychological Assessment

All neuropsychological tests were administered by an experienced neuropsychologist blind to participant carrier status. Neuropsychological tests were selected to assess global intelligence and overall cognitive status, attention, executive function, language, memory and visuospatial skills.

Global intelligence was assessed using an abbreviated form of the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III; Wechsler, 1997), including Vocabulary, Similarities, Block Design, Arithmetic, and Object Assembly subtests (López, Rodríguez, Santín, & Torrico, 2003). Attention was measured using the Variability Index from the Continuous Performance Test (CPT; Conners, 2000) and completion time from Trail-Making Test Part A (TMT-A time; Reitan, 1958). Executive functioning was evaluated with the Wisconsin Card Sorting Test (WCST-64; Heaton, 1981), completion time from Trail-Making Test Part B (TMT-B time), WAIS-III Similarities and Arithmetic Subtests WAIS-III, Phonemic Verbal Fluency (number of words beginning with “P” listed in 1 min), and the Iowa Gambling Test (IGT; Bechara, 2007). Because these tests evaluate different capacities within the executive functions, the executive function domain was subdivided into three subdomains. Cognitive shifting comprised TMT-B time and the number of Perseverative Errors from the WCST-64; reasoning and concept formation comprised Similarities and Arithmetic (WAIS-III), Conceptual level responses (WCST-64) and Phonemic Verbal Fluency; and decision making was measured with the IGT total score. Language skills were measured using the abbreviated Boston Naming Test (Fisher, Tierney, Snow, & Szalai, 1999), Vocabulary (WAIS-III), and Semantic Verbal Fluency Test (number of animals listed in 1 min). Verbal episodic memory was assessed using the Verbal Learning Test from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease (CERAD; Morris, Mohs, Rogers, Fillenbaum, & Heyman, 1988). Finally, visuospatial skills were evaluated using Block Design and Object Assembly (WAIS-III).

Statistical Analysis

We conducted data analyses using SPSS (version 19.00). Individual neuropsychological test scores were transformed into Z-scores using published normative data from NEURONORMA Study Team (Peña-Casanova et al., 2009) and from tests manuals (Bechara, 2007; Conners, 2000; Fisher et al., 1999; Heaton, 1981; Morris et al., 1988; Wechsler, 1997). Composite scores for each domain were computed by averaging the mean Z-Scores from the individual tests within

Table 1. Demographic and global cognition characteristics and neuropsychological test performance (by composite domain scores and test scores, reported as Z-scores) in A-PGRN+ and PGRN- groups

	<i>n</i>	A-PGRN+	<i>n</i>	PGRN-	<i>p</i>
Age (years)	13	49.89 (12.75)	19	52.62 (13.07)	0.560
Education (years)	13	15.42 (3.32)	19	15 (3.36)	0.729
Gender (male/female)	13	6/7	19	9/10	0.615
Total IQ (WAIS-III)	13	105.08 (12.3)	19	111.11 (14.7)	0.234
MMSE (Total Score)	13	28.62 (1.5)	19	29 (1)	0.390
Composite cognitive domains and test	<i>n</i>	Z-score	<i>n</i>	Z-score	<i>p</i>
Attention	12	-0.32 (0.88)	19	0.63 (0.64)	0.002
CPT-II Variability	12	-0.16 (1.27)	19	0.40 (1.05)	0.187
TMT-A time	13	-0.43 (0.83)	19	0.86 (0.77)	<0.001
Executive Function					
<i>Shifting Subdomain</i>	10	-0.30 (0.70)	18	0.19 (0.73)	0.107
TMT-B time	12	-0.46 (1.14)	19	0.77 (0.83)	0.002
WCST-64 Perseverative Errors	10	-0.16 (0.77)	18	-0.33 (1.20)	0.700
<i>Reasoning and concept formation subdomain</i>	10	0.20 (0.76)	18	0.35 (0.73)	0.601
Arithmetic (WAIS-III)	13	0.79 (0.84)	19	1.10 (1.10)	0.393
Similarities (WAIS-III)	13	0.50 (0.92)	19	0.86 (0.93)	0.294
Phonemic Fluency "P"	13	-0.20 (1.11)	19	0.15 (0.68)	0.265
WCST-64 Conceptual level responses	10	-0.62 (0.66)	18	-0.66 (1.10)	0.912
<i>Decision making subdomain- Total IGT</i>	13	-0.46 (0.67)	18	-0.60 (0.67)	0.560
Language	13	0.18 (0.78)	19	0.55 (0.48)	0.104
Semantic fluency "animals"	13	1.04 (0.60)	19	0.62 (0.98)	0.182
WAIS-III Vocabulary	13	0.49 (0.74)	19	0.72 (0.70)	0.391
Boston Naming-30	13	-0.99 (1.79)	19	0.32 (0.38)	0.004
Visuospatial Function	13	0.23 (0.69)	19	0.36 (0.85)	0.654
WAIS-III Block design	13	0.62 (0.72)	19	0.58 (0.73)	0.880
WAIS-III Object Assembly	13	-0.14 (0.97)	19	0.15 (1.13)	0.445
Memory- Delayed recall (CERAD)	11	-0.23 (0.75)	19	0.13 (1.12)	0.293

Note. Values are means \pm standard deviation.

MMSE = Mini Mental State Exam; CERAD = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease; CPT-II = Continuous Performance Test; IGT = Iowa Gambling Test; TMT = Trail Making Test (parts A and B); WAIS = Weschler Adult Intelligence Scale; WCST-64 = Wisconsin Card Sorting Test.

each domain. Student's *t* tests were performed for comparison of the mean scores between carriers and non-carriers. To overcome the limitation of a relatively small sample size, Cohen's *d* values were also calculated as an estimate of effect size for the between-group comparisons. Cohen's *d* values near 0.2 are considered small, 0.5 is considered moderate, and values above 0.8 are considered high.

Protocol Approval and Consent From Participants

Written informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Donostia Hospital Ethics Committee.

RESULTS

Thirty-two individuals (17 female and 15 male), from five families identified with FTD-PGRN were eligible for the study (10 participants from the family 1, 12 from the family 2, 4 from the family 3, 4 from the family 4, and 2 from the family 5) One subject was excluded because of cerebrovascular disease. There was no other eligible subject that met exclusion criteria.

Of these 32 participants, 13 subjects were asymptomatic PGRN mutation carriers (A-PGRN+) and 19 were non-carrier relatives (PGRN-). Progranulin positive and negative groups were comparable in age [mean (*SD*) = 49.89 (12.75) and 52(13.07)], sex (6 males vs. 9 males) and years of education [mean (*SD*) = 15.42 (3.32) and 15.00 (3.36)]. There were no significant differences between A-PGRN+ and PGRN- groups in estimated total-IQ (WAIS-III) (see Table 1).

Neuropsychological Comparison Between Groups

The results of composite domains and neuropsychological tests (represented as Z-scores) are presented in Table 1. The mean raw scores of each test are available in the Supplementary data table.

Supplementary Materials

To review these Supplementary Data Table, please access the online-only. Please visit journals.cambridge.org/INS, then click on the link "Supplementary Materials" at this article.

The A-PGRN+ group performed worse on tasks related to the attention domain ($t(30) = 3.487$; $p = .002$) and the effect size associated with this difference was high (Cohen's $d = 1.27$). There were not any other statistically significant differences between the two groups in the other composite cognitive domains, but we detected some significant differences when we compare the performance of the two groups in some individual neuropsychological tests.

The A-PGRN+ group performed significantly slower than the PRGN- group on TMT-A time ($t(31) = 4.509$; $p < .001$, Cohen's $d = 1.60$) and TMT-B time ($t(30) = 3.494$, $p = .002$, Cohen's $d = 1.28$). Effect sizes associated with these differences were very high (TMTA Cohens' $d = 1.60$; TMTB Cohens' $d = 1.28$). There were no significant differences between A-PGRN+ and PGRN- in the other frontal-executive and attentional tasks performed. The A-PGRN+ group also performed significantly worse on the Boston Naming Test ($t(31) = 2.598$; $p = .022$, Cohen's $d = 0.93$). There were no significant differences between groups on all other measures administered. However, non-significant trends with moderate effect sizes were observed on several measures. Thus, there may be further deficits in neuropsychological functioning in asymptomatic carriers that may be detectable with a larger sample size.

DISCUSSION

This study reveals subtle neuropsychological underperformance in c.709-1G>A progranulin asymptomatic mutation carriers compared with a healthy sample of non-carrier relatives. PGRN mutation carriers had significantly lower scores within tests of attention (TMT-A), set-shifting (TMT-B), and object naming (Boston Naming Test), which may be evidence of prodromal executive deficits and frontal dysfunction. These deficits were observed despite comparable performance on tests of general intelligence, reasoning and logic, visuospatial abilities, and memory.

These findings underscore the relevance of subtle attention, executive-mental flexibility, and language deficits that may arise as early symptoms of FTD. Previous studies in asymptomatic MAPT-mutation carriers and asymptomatic subjects with unspecified familial FTLU also reported frontal-executive, attentional, and language dysfunction before the onset of FTD (Geschwind et al., 2001). In another study (Torralva, Roca, Gleichgerrcht, Bekinschtein, & Manes, 2009), a battery of tests of executive functioning and social cognition was developed in an attempt to facilitate early diagnosis in FTD patients who have other general cognitive functions preserved, including memory, language and praxis. These "high-functioning" patients showed near-average performance on most components of a standard neuropsychological battery with the exception of TMT-A, TMT-B, the Boston Naming test and the Letters-Numbers Sequencing subtest from the WAIS-III (Torralva et al., 2009). Our results are consistent in detecting performance deficits on TMT-A, TMT-B, and the Boston Naming Test in these otherwise asymptomatic individuals. Thus, these

specific tests may be sensitive indicators of early cognitive dysfunction and/or elevated risk for FTD in PGRN mutation carriers.

The TMT simultaneously assesses functioning in multiple domains, including visual motor tracking, divided attention, mental flexibility, and motor function. A recent functional magnetic resonance imaging study observed task-activated recruitment in the dorsal frontoparietal attention network during performance of TMT-A (Tam, Churchill, Strother, & Graham, 2011). In our sample, poorer performance on the TMT-A in PGRN mutation carriers may be primarily due to an attention deficit, which is common in preclinical phases of FTD. This deficit could be related to the alteration of one of the frontal nodes of this frontoparietal attention network. In frontal lesions, the alteration of attention is typically characterized by behavioral rigidity, loss of mental flexibility and perseverative responses (Zimmerman & Leclercq, 2002). These symptoms could account for the underperformance on TMT-B in the A-PGRN+ group.

The Boston Naming Test is used to assess object naming, which is primarily a function of the dominant temporal lobe (Sawrie et al., 2000). Multiple studies have shown that FTD patients with PGRN mutations have anomia as the predominant language symptom, and this deficit may result from damage involving the temporoparietal junction (Rohrer, Crutch, Warrington, & Warren, 2010). This deficit in our A-PGRN+ group may be reflective of temporal dysfunction in a prodromal stage of FTD.

The results of this cross-sectional study suggest that subtle language, attention and executive deficits in asymptomatic PGRN mutation carriers may reflect prodromal cognitive dysfunction that precedes dementia. Alternatively, these individuals may possess these deficits across their lifespan and not just at middle age, when they may be in the early stages of FTD. Indeed, one study (Geschwind et al., 2001) demonstrated that individuals who possess the P301L mutation may exhibit frontal-executive dysfunction up to three decades before the age of predicted onset of FTD. It is possible that PGRN mutation carriers may have subtle developmental deficits that affect attentional, executive and language networks, since these domains appear to be highly susceptible to FTD pathology.

From a biological perspective, it is difficult to identify the neuropathological basis that leads an individual to develop dementia in middle age, since progranulin deficiency is a lifelong condition. Progranulin is an extracellular glycoprotein that regulates cell division, survival and migration (Bateman & Bennett, 2009). Asymptomatic relatives of FTD patients carrying PGRN mutations have low levels of circulating progranulin (Ghidoni et al., 2008). Thus, mechanisms related to the physiological role of PGRN, including neurotrophic effects and neuroprotection, are chronically dysfunctional in these individuals and not just at the age of FTD onset. Furthermore, it is plausible that presymptomatic PGRN mutation carriers show subtle neuropsychological dysfunction throughout their lives, and that these become more pronounced in middle age as FTLU develops.

A strength of this study is the homogeneity of our sample. All subjects are of Basque descent and are first-degree relatives of FTD patients with the same c.709-1G>A mutation in PGRN. Since both groups contain first-degree relatives of carriers, this design controls for other related genetic or environmental influences on cognitive function in an attempt to isolate the mutation as the sole difference between groups. Additionally, our sample comprises relatively young adults with fewer comorbidities than are typically observed in older adults at-risk for dementia. The presence of comorbidities could confound studies of risk, and as such the age range studied in our sample represents another advantage of our design. Moreover, the present study addresses a novel topic with asymptomatic PGRN mutation carriers using a comprehensive neuropsychological battery.

However, we do acknowledge some limitations of our study. First, although we have a large sample of individuals carrying this specific single mutation in PGRN, it is relatively small in terms of statistical power. For this reason, we have calculated the effect sizes for the main results to complement traditional significance testing. Second, our results may reflect progranulin haploinsufficiency rather than risk for FTD, since all mutation carriers possess progranulin deficiencies and not all develop FTD. Furthermore, since there are multiple etiologies of FTD, it is questionable whether these findings can be generalized to the entire population of FTD patients.

In summary, our results provide insight concerning the neuropsychological performance of presymptomatic PGRN mutation carriers and suggest that the disease process begins before the onset of clinically significant symptoms of FTD. A more complete understanding of early symptoms of FTD that may be related to progranulin haploinsufficiency will be crucial for targeting potential novel therapeutic interventions in PGRN mutation carriers.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the generous contribution of the families who participated in the study. We also thank the Research and Editing Consulting Program, specially John L. Woodard and Mike Sugarman.

REFERENCES

Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., ... Hutton, M. (2006). Mutation in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*, *442*, 916–919.

Bateman, A., & Bennett, H.P. (2009). The granulin gene family: From cancer to dementia. *Bioessays*, *31*, 1245–1254.

Bechara, A. (2007). *Iowa Gambling Task*. Lutz, FL: Psychological Assessment Resources.

Conners, C.K. (2000). *Continuous Performance Test II*. Toronto: Multi-Health Systems.

Cruts, M., Gijselink, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., ... Van, B.C. (2006). Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*, *442*, 920–924.

Fisher, N.J., Tierney, M.C., Snow, W.G., & Szalai, J.P. (1999). Odd/Even short forms of the Boston Naming test: Preliminary geriatric norms. *Clinical Neuropsychology*, *13*(3), 359–364.

Geschwind, D.H., Robidoux, J., Alarcon, M., Miller, B.L., Wilhelmsen, K.C., Cummings, J.L., & Nasreddine, Z.S. (2001). Dementia and neurodevelopmental predisposition: Cognitive dysfunction in presymptomatic subjects precedes dementia by decades in frontotemporal dementia. *Annals of Neurology*, *50*, 741–746.

Ghidoni, R., Benussi, L., Glionna, M., Franzoni, M., & Binetti, G. (2008). Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*, *71*, 1235–1239.

Heaton, R.K. (1981). *Wisconsin Card Sorting Test (WCST)*. Odessa, FL: Psychological Assessment Resources.

López, M.J., Rodríguez, J.M., Santín, C., & Torrico, E. (2003). Utilidad de las formas cortas de la Escala de Inteligencia de Wechsler para Adultos (WAIS). *Anales de Psicología*, *19*, 53–63.

López de Munain, A., Alzualde, A., Gorostidi, A., Otaegui, D., Ruiz-Martínez, J., Indakoetxea, B., ... Martí Massó, J.F. (2008). Mutations in progranulin gene: Clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biological Psychiatry*, *63*, 946–952.

Moreno, F., Indakoetxea, B., Barandiaran, M., Alzualde, A., Gabilondo, A., Estanga, A., ... López de Munain, A. (2009). “Frontotemporoparietal” dementia: Clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology*, *73*, 1367–1374.

Morris, J.C., Mohs, R.C., Rogers, H., Fillenbaum, G., & Heyman, A. (1988). CERAD: Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer’s disease. *Psychopharmacological Bulletin*, *24*, 641–652.

Peña-Casanova, J., Blesa, R., Aguilar, M., Gramunt-Fombuena, N., Gómez-Ansón, B., Oliva, R., ... Sol, J.M., for the NEURO-NORMA Study Team (2009). Spanish multicenter normative studies (NEURONORMA Project): Methods and simple characteristics. *Archives of Clinical Neuropsychology*, *24*, 307–319.

Reitan, R.M. (1958). Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. *Perceptual and Motor Skills*, *8*, 271–276.

Rohrer, J.D., Crutch, S.J., Warrington, E.K., & Warren, J.D. (2010). Progranulin-associated primary progressive aphasia: A distinct phenotype? *Neuropsychologia*, *48*, 288–297.

Rohrer, J.D., & Warren, J.D. (2011). Phenotypic signatures of genetic frontotemporal dementia. *Current Opinion in Neurology*, *24*, 542–549.

Sawrie, S., Martin, R.C., Gillian, F.G., Faight, R.E., Maton, B., Hugg, J.W., ... Kuzniecky, R.I. (2000). Visual confrontation naming and hippocampal function. A neural network study using quantitative 1 H magnetic resonance spectroscopy. *Brain*, *123*, 770–780.

Tam, F., Churchill, N.W., Strother, S.C., & Graham, S.J. (2011). A new tablet for writing and drawing during functional MRI. *Human Brain Mapping*, *32*, 240–248.

Torralva, T., Roca, M., Gleichgerrcht, E., Bekinschtein, T., & Manes, F. (2009). A neuropsychological battery to detect specific executive and social cognitive impairments in early frontotemporal dementia. *Brain*, *132*, 1299–1309.

Wechsler, D. (1997). *Wechsler Adult Intelligence Scale-III*. San Antonio: The Psychological Corporation.

Zimmerman, P., & Leclercq, M. (2002). Neuropsychological aspects of attentional functions and disturbances. In M. Leclercq & P. Zimmerman (Eds.), *Applied neuropsychology of attention: Theory, diagnosis and rehabilitation*. New York: Psychology Press.



Distinctive age-related temporal cortical thinning in asymptomatic granulin gene mutation carriers

Fermín Moreno^{a,b,c,*}, Roser Sala-Llloch^{d,e,1}, Myriam Barandiaran^{a,b,c}, Raquel Sánchez-Valle^{e,f}, Ainara Estanga^{b,c}, David Bartrés-Faz^{d,e}, Andone Sistiaga^{b,c,g}, Ainhoa Alzualde^{b,c}, Esther Fernández^h, José Félix Martí Massó^{a,b,c}, Adolfo López de Munain^{a,b,c}, Begoña Indakoetxea^{a,b,c}

^a Cognitive Disorders Unit, Department of Neurology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), area 6, Institute Carlos III, Spain

^c Neuroscience Area, Institute Biodonostia, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

^d Departament de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

^e Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Catalonia, Spain

^f Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

^g Personality, Psychological Assessment and Psychological Treatments Department, Faculty of Psychology, University of the Basque Country, San Sebastian, Spain

^h OSATEK Unidad de Donostia, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2012

Received in revised form 12 October 2012

Accepted 12 November 2012

Available online 4 December 2012

Keywords:

Progranulin

Granulin

Frontotemporal dementia

Frontotemporal lobar degeneration

MRI

Cortical thickness

Preclinical

ABSTRACT

Studies in asymptomatic granulin gene (*GRN*) mutation carriers are essential to improve our understanding of the pattern and timing of early morphologic brain changes in frontotemporal lobar degeneration. The main objectives of this study were to assess the effect of age in cortical thickness changes (CTh) in preclinical *GRN* mutation carriers and to study the relationship of CTh with cognitive performance in *GRN* mutation carriers. We calculated CTh maps in 13 asymptomatic carriers of the c.709-1G>A *GRN* mutation and 13 age- and sex-matched healthy subjects. Asymptomatic *GRN* mutation carriers presented different patterns of age-related cortical thinning in the right superior temporal and middle temporal gyri and the banks of the superior temporal sulcus bilaterally when compared with controls. Cortical thickness was correlated with neuropsychological test scores: Trail Making Tests A and B, and the Boston Naming Test. Distinctive age-related cortical thinning in asymptomatic *GRN* mutation carriers in lateral temporal cortices suggests an early and disease-specific effect in these areas.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Mutations in the granulin gene (*GRN*; MIM# 138945) were identified in 2006 as a causal mechanism underlying frontotemporal lobar degeneration (FTLD) (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006). More than 60 pathogenic point mutations and some deletions in the *GRN* gene have been identified (Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database; <http://www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations>); these account for approximately 10% of FTLD cases and in some series are the most common cause of genetic dementia. Our group identified the c.709-1G>A (Ala237Trpfsx4) mutation in the *GRN* gene in a relatively large

series of patients with FTLD from the Basque Country (López de Munain et al., 2008; Moreno et al., 2009). Several studies have demonstrated that patients with FTLD in association with *GRN* mutations show an asymmetric and widespread pattern of gray matter loss, predominantly affecting the frontal, posterior temporal, and inferior parietal cortices (Beck et al., 2008; Rohrer et al., 2010; Whitwell et al., 2007, 2009). Little is known, however, about brain morphology in asymptomatic *GRN* mutation carriers. In *GRN* mutation carriers the age of clinical onset varies widely, even within the same family, and is not currently possible to predict the exact age of disease onset in an asymptomatic individual. However, as the penetrance of the disease increases with age, in a group, age could be considered a proxy measure of time to disease onset.

Semiautomatic methods of magnetic resonance imaging (MRI) processing, such as the surface-based measurement of cortical thickness (CTh), permit the calculation of vertex-to-vertex CTh statistics across the entire cortical mantle (Fischl and Dale, 2000), and comparison of extensive cortical regions or atlas-based

* Corresponding author at: Department of Neurology, Hospital Donostia, Paseo Dr Begiristain sn, CP 20014, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain. Tel.: +34 943 007027; fax: +34 943 007061.

E-mail address: fermin.morenoizco@osakidetza.net (F. Moreno).

¹ These authors contributed equally to this work.

parcellations between groups more rapidly and with a higher interrater reliability (Desikan et al., 2006). CTh analysis has proven its usefulness in detecting widespread cortical abnormalities in early phases of several neurodegenerative diseases, even before clinical onset (Dickerson et al., 2009; Fortea et al., 2010).

The objectives of this study were: (1) to assess cortical structural changes in preclinical c.709-1G>A *GRN* mutation carriers and their correlation with age as an estimate of disease onset proximity; and (2) to study the relationship of CTh with cognitive performance in *GRN* mutation carriers.

2. Methods

2.1. Study population

Thirteen asymptomatic individuals carrying the c.709-1G>A *GRN* mutation (from 6 different families) and 13 control subjects were included in the study. As a control group (noncarriers) we included 9 first-degree relatives without the mutation and 4 control volunteers. We included these unrelated volunteers to prioritize age and sex matching that was not possible with only members of the FTL-*GRN* families. Written informed consent was obtained from all subjects before enrollment and the study was approved by the Donostia Hospital Ethics Committee.

2.2. Clinical and cognitive assessment

Subjects were interviewed by an experienced clinician and no changes in cognitive function or behavior were detected. Further, they had no comorbidities known to affect brain structure. All the subjects belonging to the FTL-*GRN* families (carriers and noncarriers) were administered an extensive battery of cognitive tests: the Mini-Mental State Examination, short form of the Wechsler Adult Intelligence Scale III, Continuous Performance Test, Digit Span, Trail Making Tests A and B (TMT-A and -B), Wisconsin Card Sorting Test, phonetic and semantic verbal fluency, Iowa Gambling Task, Boston Naming Test (BNT), verbal learning test from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease, and abbreviated Pictures of Facial Affect test. They all scored within the normal range in all the tests administered. In a previous study, with the same group of *GRN* mutation carriers and a slightly different control group (prioritizing being related rather than age and sex matching) we found that *GRN* mutation carriers obtained significantly lower scores than noncarrier relatives on the TMT-A, TMT-B, and BNT (Barandiaran et al., 2012).

2.3. Image acquisition

The MRI was performed on a 1.5 T scanner (Achieva Nova, Philips), with high-resolution volumetric turbo-field echo sequences (sagittal T1-weighted 3-D acquisition, repetition time [TR] = 7.2, echo time [TE] = 3.3, flip angle = 8°, matrix = 256 × 232, slice thickness of 1 mm, voxel dimensions of 1 × 1 × 1 mm, number of slices [NSA] = 1160). All the scans were acquired on the same MRI scanner and no hardware or software upgrades were carried out during the study period.

2.4. Processing of MRI images

We used the methods implemented in the FreeSurfer software (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) to perform cortical surface reconstruction of the structural T1-weighted images. Briefly, the procedures carried out in the FreeSurfer pipeline include motion correction, skull stripping (Segonne et al., 2004), segmentation of the subcortical white matter and deep gray matter volumetric

structures (Fischl et al., 2002, 2004), tessellation of boundaries, and definition of the transition between tissue classes (Dale et al., 1999; Fischl and Dale, 2000). Then, CTh was calculated as the closest distance from the gray/white boundary to the gray/cerebrospinal fluid boundary at each vertex (Fischl and Dale, 2000). The automated FreeSurfer procedures also include parcellation of the cerebral cortex into units based on gyral and sulcal structure (Desikan et al., 2006). The maps produced are not restricted to the voxel resolution of the original data, and hence are capable of detecting submillimeter differences between groups.

2.5. Statistical analysis

Group analyses of demographic and cognitive data were performed using Predictive Analysis Software (PASW version 17, IBM). Two-tailed Student *t* tests or analysis of variance were used for continuous and χ^2 tests for categorical variables. Correlation analysis was also performed between continuous variables.

As regards the imaging data, after visual inspection of cortical maps and subcortical segmentation, the reconstructed spherical maps were used to investigate patterns in the groups. Spherical vertex-wise data were registered to a standard template and smoothed using a full width at half maximum of 15 mm.

Analyses on whole-brain CTh maps were conducted using the Qdec tool from FreeSurfer. As a preliminary study we performed a *t* test comparison between groups. Age and sex were introduced as nuisance covariates in this comparison. Then, we examined the effect of age on the CTh maps separately for each group. For that purpose, whole brain CTh maps were regressed against the age of the subjects in 2 separate analyses for controls and mutation carriers. This separate analysis was performed to discriminate effects caused by the mutation from those provoked by age itself. Furthermore, a complementary analysis of the interference between age and group effects was performed with all the subjects. The interference analysis was designed to detect areas in which the slope of the age-CTh correlation differed between groups. Finally, we explored the correlations between whole-brain CTh and the cognitive tests previously found to be significantly different between *GRN* mutation carriers and noncarriers (TMT-A, TMT-B, and BNT scores) (Barandiaran et al., 2012).

In all the analyses, resulting maps were corrected for family-wise errors (FWEs) using Monte Carlo simulations with 10,000 iterations, and only clusters with a corrected cluster-wise threshold of $p < 0.05$ were considered. Lastly, the average CTh within the atlas-based parcellations (Desikan et al., 2006) was extracted and we examined correlations between age and these measures in each group using Pearson correlation implemented in PASW software. In addition, a multivariate analysis of age by group interaction effects was also modeled.

3. Results

Carriers had a mean age of 53.77 (SD, 11.50; range: 24–71 years) and noncarriers 52.77 (SD, 13.78; range, 24–71) years. The male/female ratio was 6/7 in both groups. There were no significant differences in age or sex between the groups. Individual results for the neuropsychological tests in *GRN* mutation carriers are shown in Supplementary Table 1.

3.1. Cortical thickness group comparisons

There were no significant differences between carriers and controls in whole brain CTh maps after correcting for multiple comparisons.

When we examined the effect of age within the carrier group, CTh was negatively correlated with age in several brain regions (Fig. 1A and Supplementary Table 2). The correlation slope was calculated using the average CTh within the statistically significant clusters (Pearson $r = -0.95$; $p < 0.001$; plot in Fig. 1A). Analysis of the relationship between age and CTh within the noncarrier group revealed a cluster of age-related thinning in the right hemisphere, spanning part of the precentral and postcentral gyri (Fig. 1B). The correlation slope was calculated using the average CTh within this cluster (Pearson $r = -0.86$; $p < 0.001$; plot in Fig. 1B).

Then, to further analyze the differences on the correlation slope between groups, we performed an age by group interaction analysis. We found a cluster of significant slope differences between groups (Fig. 2). This cluster included areas within the right superior and middle temporal cortex. In this region, though for the noncarrier group the CTh remained stable as a function of age (Pearson $r = 0.012$; $p = 0.97$), there was a significant negative correlation for the carrier group ($r = -0.911$; $p < 0.001$).

To confirm the findings reported above, we analyzed correlations between age and averaged CTh in the superior temporal and middle temporal gyri and bankssts using the atlas-based parcellations (Desikan et al., 2006). In the right hemisphere we found a significant negative correlation with age in all these regions in the carrier group, but not in noncarriers. In contrast, in the left hemisphere, only the CTh of the bankssts parcellation in the carrier group was significantly negatively correlated with age (Fig. 3). However, the analysis of age by group interaction in region of interest-averaged CTh values was not significant in any of the regions analyzed ($p = 0.72$ for left bankssts; $p = 0.33$ for right

bankssts; $p = 0.58$ for right superior temporal; and $p = 0.41$ for right middle temporal).

Although groups were age- and sex-matched, we performed both the age-correlation and the age by group interaction analyses considering sex as a covariate. The results did not change, indicating no sex interference on the reported age-related thinning (data not shown).

3.2. Correlations with neuropsychological measures

Cortical thickness was negatively correlated with TMT-A scores (as measured in seconds to accomplish the task; lower scores indicating better performance) in several regions of the cortex in the mutation carrier group, both in left and right hemispheres ($p < 0.05$, FWE-corrected). Cluster characteristics and locations are summarized in Fig. 4A and Supplementary Table 3. After adjusting for age, the correlation continued to be statistically significant for only 1 cluster in the right frontal lobe (precentral and caudal middle frontal gyri and pars opercularis).

Cortical thickness was also negatively correlated with TMT-B scores in several regions of the cortex in the mutation carrier group, both in left and right hemispheres ($p < 0.05$, FWE-corrected). Similarly, cluster characteristics and locations are summarized in Fig. 4B and Supplementary Table 3. After adjusting for age, this correlation was again statistically significant for only 1 cluster, in this case in the right temporal lobe (superior temporal, middle temporal, and inferior temporal gyri, and bankssts).

Lastly, cortical thickness was positively correlated with the BNT scores (total number of correctly appointed items) in the carrier group. Clusters for which p exceeded a corrected significance level of 0.05 are summarized in Fig. 4C and Supplementary Table 3. After

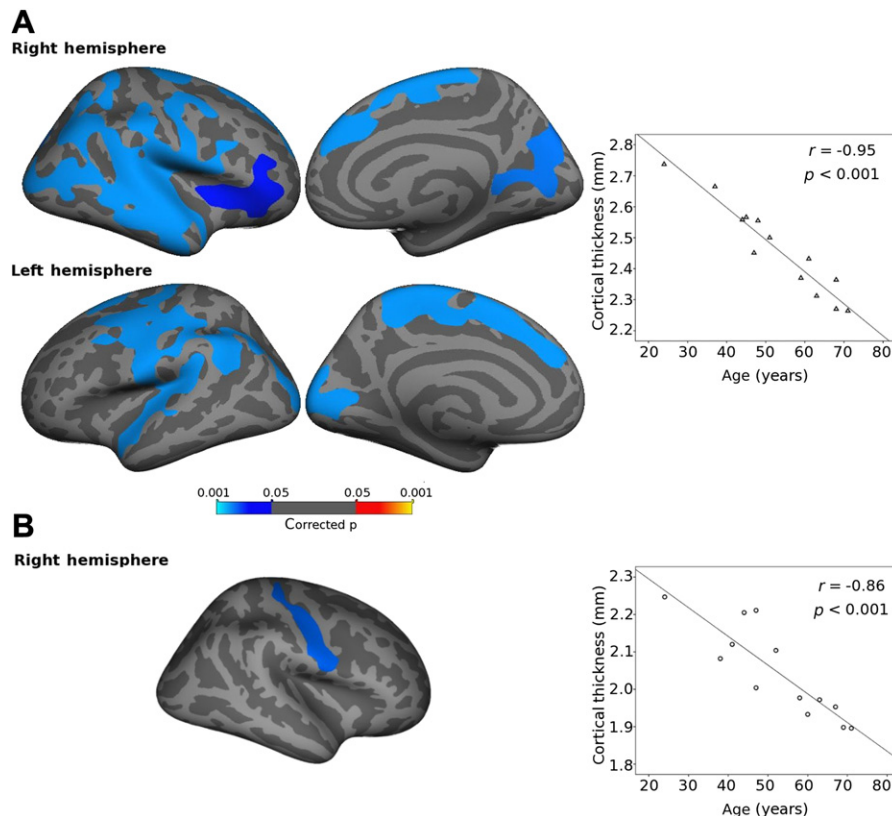


Fig. 1. Correlation analysis between cortical thickness and age. Results for the GRN mutation carriers group (A), and for the noncarriers control group (B). Only clusters with a $p < 0.05$ family-wise error-corrected level of significance are shown. Cortical thickness values in the scatter plots (right panels) are the mean cortical thickness for each subject within all the regions found to be significant in the correlation analysis.

Right hemisphere

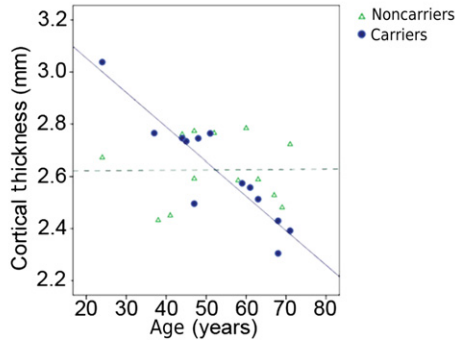
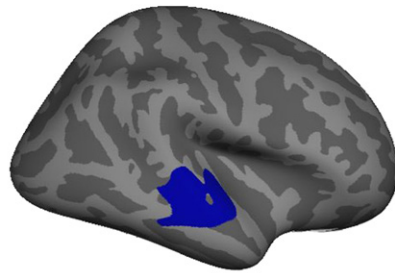


Fig. 2. Voxel-wise group interaction of cortical thickness with the effect of age. The region shown in blue has a corrected *p* value of 0.03. Cortical thickness (CTh) values in the scatter plot (right panel) are the mean CTh for each subject within the significant cluster in the map, and the blue and dashed green lines represent the correlations between CTh and age separately for each group (this being nonsignificant for the noncarrier group).

adjusting for age, however, there were no areas in which the correlation remained significant.

4. Discussion

In this study, we assessed the effect of age in cortical thinning in asymptomatic c.709-1G>A *GRN* carriers compared with a group of age- and sex-matched healthy control subjects and found a distinctive age-related effect of the mutation in lateral temporal cortices. Previous studies in asymptomatic *GRN* mutation carriers have not found differences in gray matter density (Borroni et al., 2008, 2012). Considering this, we investigated the effect of age on CTh in mutation carriers and found a significant negative correlation between CTh and age in extensive areas of the brain, mainly in the lateral temporal lobe but also in parietal, dorsomedial frontal, and even pericalcarine cortical regions. Because some of the cortical thinning observed in mutation carriers could be because of aging and not to the disease process, we assessed the interaction of mutation carrier status with age in the loss pattern. The age effect was observed to be different in mutation carriers

and control subjects in lateral temporal regions, involving the right superior and middle temporal gyri and both banks of the superior temporal sulcus. This finding was confirmed by analyzing the effect of age on cortical thinning in atlas-based parcellations: there was a significant negative correlation between CTh and age among mutation carriers, but not among control subjects, suggesting a specific and early effect of the disease process in lateral temporal areas. Supporting this hypothesis, previous studies of age-related cortical thinning in healthy subjects have demonstrated relative sparing of the lateral temporal cortex (Fjell et al., 2009; Salat et al., 2004). However, we could not replicate the results obtained in the voxel-wise interaction analysis by using the averaged CTh in the atlas-based parcellations. We attribute this discrepancy to the fact that atlas-based parcellations span to areas that might include a large number of voxels in which the interaction effect does not exist. Thus, averaging across voxels can decrease the power to detect differences. Furthermore, age correlations are strong in the carrier group but nonsignificant in control subjects, and this might also prevent finding differences between the 2 slopes.

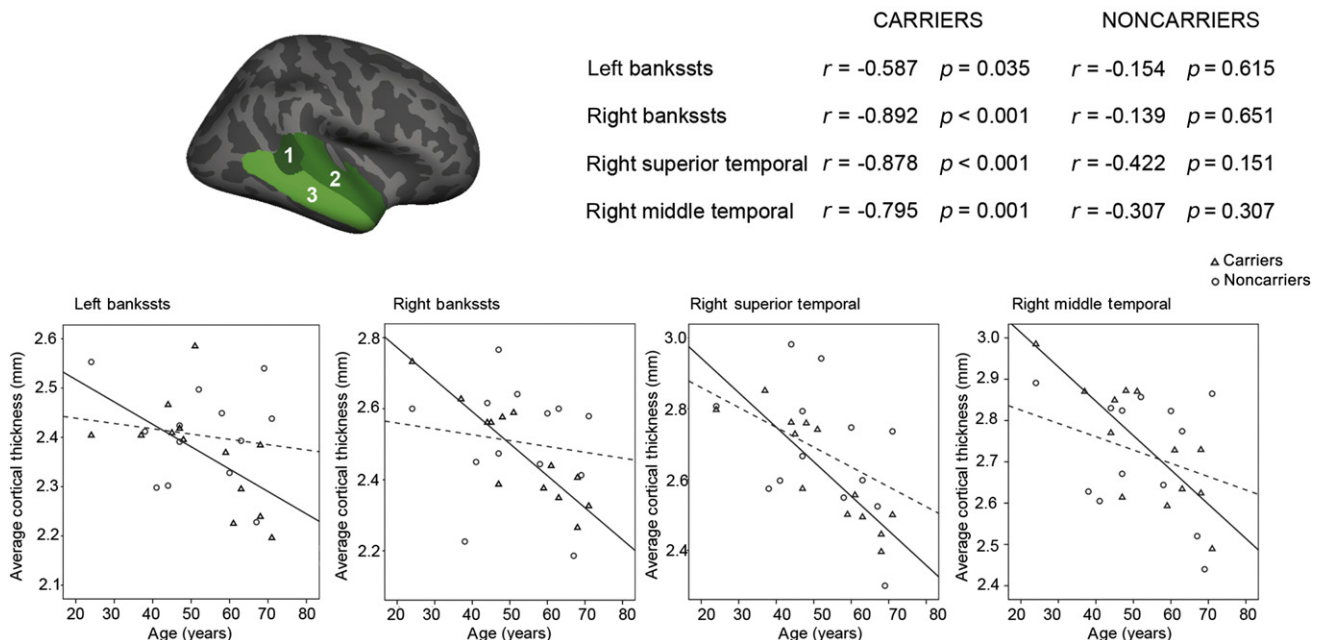


Fig. 3. Cortical thickness analysis based on a priori selected regions. Analysis of the average cortical thickness within the atlas-based parcellations of the banks of the superior temporal sulcus (bankssts) (1), the superior temporal (2), and the middle temporal gyrus (3).

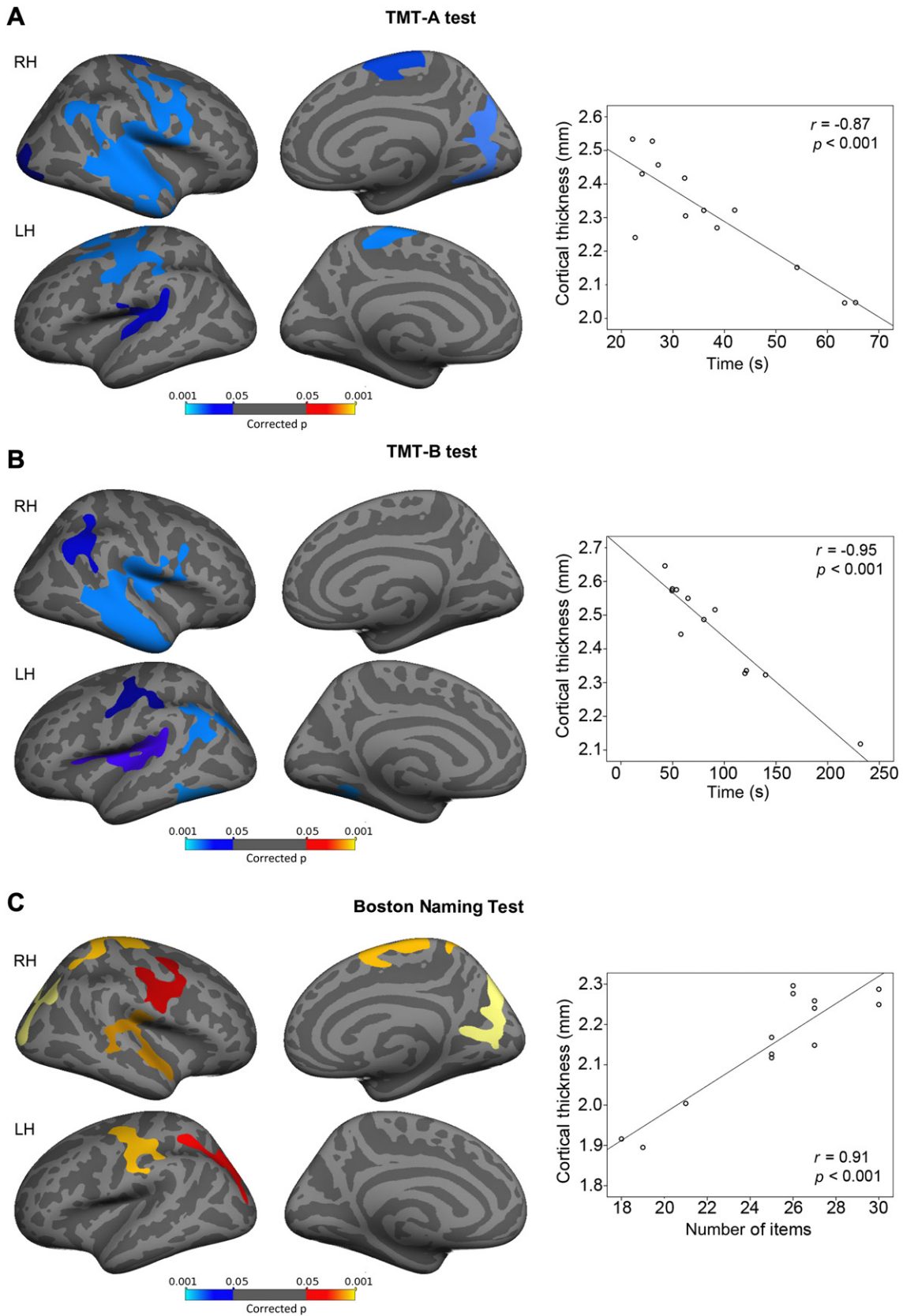


Fig. 4. Correlation analysis between cortical thickness and neuropsychological test scores for the GRN mutation carriers. All maps are thresholded at $p < 0.05$ family-wise error-corrected level. Clusters in cold colors represent areas with negative correlations, and clusters in hot colors represent areas where the correlation is positive. Scatter plots on the right represent mean cortical thickness within all the significant regions for each map on the left, and its correlation with the measure obtained for each of the tests used. (A) Correlation with TMT-A scores, (B) correlation with TMT-B scores, and (C) correlation with Boston Naming Test scores. Abbreviations: LH, left hemisphere; RH, right hemisphere; TMT-A, Trail Making Test A; TMT-B, Trail Making Test B.

MRI studies in symptomatic *GRN* mutation carriers have shown asymmetric and widespread gray matter loss involving several regions in the frontal, temporal, and parietal cortices (Beck et al., 2008; Rohrer et al., 2010; Whitwell et al., 2007, 2009). This pattern of atrophy described with *GRN* mutations is very similar to that seen in patients with FTLD-43-kD transactive response (TAR)-DNA-binding protein (TDP) type A (Mackenzie et al., 2011) without *GRN* mutations; however, comparing the 2, those with *GRN* mutations were found to have significantly more lateral temporal lobe atrophy (Whitwell et al., 2010). Microtubule-associated protein tau (MAPT) mutations are another common cause of genetic FTLD, accounting for approximately 10% of cases (Rohrer and Warren, 2011). Comparing symptomatic *GRN* and MAPT mutation carriers, gray matter loss has been found to occur mostly in posterior lateral temporal and parietal lobes and asymmetric in *GRN*, but symmetric and in the anteromedial temporal lobe, orbitofrontal areas, and fornix in MAPT mutations carriers (Rohrer et al., 2010, 2011; Whitwell et al., 2009). Thus, the atrophy profile of *GRN* mutations suggests involvement of a dorsal and asymmetric anterior cingulate–dorsal insula–posterolateral temporal–parietal network, and that of MAPT mutations is consistent with involvement of a ventral orbitofrontal–medial temporal–ventral insula network (Rohrer et al., 2010). Although the smaller magnitude of changes at asymptomatic stages makes it more difficult to obtain conclusive results, studies in asymptomatic mutation carriers allow identification of the first target areas of the disease. Overall, we believe that our finding of marked lateral temporal involvement in the earliest phases of the disease is consistent with previous studies in symptomatic patients. Our findings of age-related cortical thinning in *GRN* mutation carriers in the temporal lobe are more robust for the right hemisphere. However, we think this right predominance relies on statistical issues and random in an asymmetric disease rather than on a clear biological basis. In the clinical analysis of our FTLD-*GRN* patients (most of them relatives of the c.709-1G>A asymptomatic mutation carriers of this study) there was no clinical or neuroimaging finding suggesting a left or right predominance.

To the best of our knowledge, only 3 neuroimaging studies in asymptomatic *GRN* mutation carriers have been published previously (Borroni et al., 2008, 2012; Rohrer et al., 2008). Borroni et al. (2008, 2012) did not find any structural cortical differences in asymptomatic *GRN* mutation carriers compared with control subjects using voxel-based morphometry, but observed reduced fractional anisotropy in white matter areas using diffusion tensor imaging in asymptomatic *GRN* mutation carriers affecting the left uncinate and left inferior occipitofrontal fasciculi (Borroni et al., 2008). These fiber tracts are part of the perisylvian language network and connect temporal areas involved in sound recognition and semantic processing with frontal and occipital lobes (Mandonnet et al., 2007; Schmahmann et al., 2007). In another study, Borroni et al. (2012) also found an increase in functional connectivity within the salience network in the resting state functional MRI analysis of *GRN* mutation carriers compared with control subjects. Rohrer et al. (2008) evaluated a *GRN* mutation carrier longitudinally and detected asymmetrical frontal, temporal, and parietal lobe atrophy 18 months before clinical onset. The authors noted that the left middle and inferior temporal and fusiform gyri were particularly affected at the approximate time of clinical onset.

With the same subset of asymptomatic *GRN* carriers we demonstrated, in a previous study (Barandiaran et al., 2012), significantly poorer performance (although within the normal range) on the TMT-A, TMT-B, and BNT compared with control

subjects. In the present study, testing the correlation of CTh with neuropsychological performance, we found that among c.709-1G>A *GRN* mutation carriers TMT-A, TMT-B, and BNT scores were significantly correlated with atrophy in several regions, mostly in the frontal and temporal lobes. However, the relationship between cortical thinning in these areas and test performance is difficult to interpret because these tests assess multiple functions (particularly TMTs) (Sánchez-Cubillo et al., 2009). Moreover, studies with functional MRI have shown that the brain–behavior correlations for these tests are multifaceted involving different areas, with modest value as localizing tools (Moll et al., 2002; Zakzanis et al., 2005). For this reason, we believe that these neuropsychological correlations in our asymptomatic subjects could represent an association between 2 different early disease markers (cognitive performance in disease-relevant tests and cortical thinning with age) rather than a direct association.

The main strength of this study lies in the homogeneity of the sample: all carriers had the same c.709-1G>A mutation in *GRN* and most noncarriers were first-degree relatives of the carriers. In particular, using noncarrier close relatives could partially control for other related genetic or environmental influences on brain morphology. Further, the surface-based neuroimaging method enables measurements of CTh throughout the entire cortex, is more sensitive, and is preferable for studying diseases in which cortical structures are primarily involved. However, we acknowledge that our study has some limitations. First, although this is a relatively large sample of asymptomatic subjects carrying a single mutation in *GRN*, it is fairly small in terms of statistical power. The other main weakness of this study is that absolute age is only a rough estimate of the time to disease onset. There are other genetic forms of neurodegenerative diseases (i.e., Alzheimer's disease because of mutations in the presenilin-1 gene) inherited with an autosomal dominant pattern, and almost complete penetrance in which age of onset of disease is very predictable within a family. These forms constitute an ideal scenario to study preclinical stages of the disease (Forkea et al., 2010). In the case of FTLD-*GRN*, penetrance increases with age. The analysis of the Basque's cluster with the c.709-1G>A mutation showed 37% of mutation carriers to be affected by the age of 60, and 87% of carriers were affected at 70 years of age (Moreno et al., 2009). In this scenario age is approximate, but we believe to be the best estimate to predict time to disease onset.

In conclusion, asymptomatic c.709-1G>A *GRN* mutation carriers might have a different pattern of age-related cortical thinning in superior and middle temporal gyri and the banks of the superior temporal sulcus compared with noncarriers, suggesting an early and disease-specific effect in these areas. This finding, combined with the results of previous studies in *GRN* and MAPT mutation carriers and sporadic FTLD, suggests that *GRN* mutation-linked neurodegeneration might involve different early target areas than sporadic or MAPT mutation-associated FTLD.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest.

Written informed consent was obtained from all subjects before enrollment and the study was approved by the Hospital Donostia Ethics Committee.

Acknowledgements

The authors thank the subjects who participated in the study. This study has been partially supported by the Basque Government (SAIOTEK program, BRAINER study, exp.: S-PR08UN01).

Drs López de Munain and Martí Massó receive research support from the Instituto de Salud Carlos III. Dr Sánchez-Valle receives research support from the Instituto de Salud Carlos III (Grant FIS080036). David Bartrés-Faz and Roser Sala-Llloch are supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grants: SAF2009-07489 and BES-2011-047053, respectively).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.005>.

References

- Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C.A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H., Hutton, M., 2006. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442, 916–919.
- Barandiarán, M., Estanga, A., Moreno, F., Indakoetxea, B., Alzualde, A., Balluerka, N., Martí Massó, J.F., López de Munain, A., 2012. Neuropsychological features of asymptomatic c.709-1G>A progranulin mutation carriers. *JINS* 18, 1086–1090.
- Beck, J., Rohrer, J.D., Campbell, T., Isaacs, A., Morrison, K.E., Goodall, E.F., Warrington, E.K., Stevens, J., Revesz, T., Holton, J., Al-Sarraj, S., King, A., Scallan, R., Warren, J.D., Fox, N.C., Rossor, M.N., Collinge, J., Mead, S., 2008. A distinct clinical, neuropsychological and radiological phenotype is associated with progranulin gene mutations in a large UK series. *Brain* 131, 706–720.
- Borroni, B., Alberici, A., Cercignani, M., Premi, E., Serra, L., Cerini, C., Cosseddu, M., Pettenati, C., Turla, M., Archetti, S., Gasparotti, R., Caltagirone, C., Padovani, A., Bozzali, M., 2012. Granulin mutation drives brain damage and reorganization from preclinical to symptomatic FTL. *Neurobiol. Aging* 33, 2506–2520.
- Borroni, B., Alberici, A., Premi, E., Archetti, S., Garibotto, V., Agosti, C., Gasparotti, R., Di Luca, M., Perani, D., Padovani, A., 2008. Brain magnetic resonance imaging structural changes in a pedigree of asymptomatic progranulin mutation carriers. *Rejuvenation Res.* 11, 585–595.
- Cruts, M., Gijssels, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenbergh, R., Dermaut, B., Martin, J.J., van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P.P., Kumar-Singh, S., Van Broeckhoven, C., 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442, 920–924.
- 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., Segonne, F., Fischl, B., Quinn, B.T., Dickerson, B.C., Blacker, D., Buckner, R.L., Dale, A.M., Maguire, R.P., Hyman, B.T., Albert, M.S., Killiany, R.J., 2006. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 31, 968–980.
- Dickerson, B.C., Bakkour, A., Salat, D.H., Feczko, E., Pacheco, J., Greve, D.N., Grodstein, F., Wright, C.I., Blacker, D., Rosas, H.D., Sperling, R.A., Atri, A., Growdon, J.H., Hyman, B.T., Morris, J.C., Fischl, B., Buckner, R.L., 2009. The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb. Cortex* 19, 497–510.
- Fischl, B., Dale, A.M., 2000. Measuring the thickness of the human cerebral cortex for magnetic resonance images. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11050–11055.
- Fischl, B., Salat, D.H., Busa, E., Albert, M., Dieterich, M., Haselgrove, C., van der Kouwe, A., Killiany, R., Kennedy, D., Klaveness, S., Montillo, A., Makris, N., Rosen, B., Dale, A.M., 2002. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 33, 341–355.
- Fischl, B., Salat, D.H., van der Kouwe, A.J., Makris, N., Segonne, F., Quinn, B.T., Dale, A.M., 2004. Sequence-independent segmentation of magnetic resonance images. *Neuroimage* 23, S69–S84.
- Fjell, A.M., Westlye, L.T., Amlie, I., Espeseth, T., Reinvang, I., Raz, N., Agartz, I., Salat, D.H., Greve, D.N., Fischl, B., Dale, A.M., Walhovd, K.B., 2009. High consistency of regional cortical thinning in aging across multiple samples. *Cereb. Cortex* 19, 2001–2012.
- Fortea, J., Sala-Llloch, R., Bartrés-Faz, D., Bosch, B., Lladó, A., Bargalló, N., Molinuevo, J.L., Sánchez-Valle, R., 2010. Increased cortical thickness and caudate volume precede atrophy in PSEN1 mutation carriers. *J. Alzheimers Dis.* 22, 909–922.
- López de Munain, A., Alzualde, A., Gorostidi, A., Otaegui, D., Ruiz-Martínez, J., Indakoetxea, B., Ferrer, I., Pérez-Tur, J., Sáenz, A., Bergareche, A., Barandiarán, M., Poza, J.J., Zabalza, R., Ruiz, I., Urtaun, M., Fernández-Manchola, I., Olasagasti, B., Espinal, J.B., Olaskoaga, J., Ruibal, M., Moreno, F., Carrera, N., Massó, J.F., 2008. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol. Psychiatry* 63, 946–952.
- Mackenzie, I.R., Neumann, M., Baborie, A., Sampathu, D.M., Du Plessis, D., Jaros, E., Perry, R.H., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M., Lee, V.M., 2011. A harmonized classification system for FTL-TDP pathology. *Acta Neuropathol.* 122, 111–113.
- Mandonnet, E., Nouet, A., Gatignol, P., Capelle, L., Duffau, H., 2007. Does the left inferior longitudinal fasciculus play a role in language? A brain stimulation study. *Brain* 130, 623–629.
- Moll, J., de Oliveira-Souza, R., Moll, F.T., Bramati, I.E., Andreiuolo, P.A., 2002. The cerebral correlates of set-shifting: an fMRI study of the trail making test. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60, 900–905.
- Moreno, F., Indakoetxea, B., Barandiarán, M., Alzualde, A., Gabilondo, A., Estanga, A., Ruiz, J., Ruibal, M., Bergareche, A., Martí-Massó, J.F., López de Munain, A., 2009. “Frontotemporoparietal” dementia. Clinical phenotype associated with the c.709-1G>A PGRN mutation. *Neurology* 73, 1367–1374.
- Rohrer, J.D., Lashley, T., Schott, J.M., Warren, J.E., Mead, S., Isaacs, A.M., Beck, J., Hardy, J., de Silva, R., Warrington, E., Troakes, C., Al-Sarraj, S., King, A., Borroni, B., Clarkson, M.J., Ourselin, S., Holton, J.L., Fox, N.C., Revesz, T., Rossor, M.N., Warren, J.D., 2011. Clinical and neuroanatomical signatures of tissue pathology in frontotemporal lobar degeneration. *Brain* 134, 2565–2581.
- Rohrer, J.D., Ridgway, G.R., Modat, M., Ourselin, S., Mead, S., Fox, N.C., Rossor, M.N., Warren, J.D., 2010. Distinct profiles of brain atrophy in frontotemporal lobar degeneration caused by progranulin and tau mutations. *Neuroimage* 53, 1070–1076.
- Rohrer, J.D., Warren, J.D., 2011. Phenotypic signatures of genetic frontotemporal dementia. *Curr. Opin. Neurol.* 24, 542–549.
- Rohrer, J.D., Warren, J.D., Barnes, J., Mead, S., Beck, J., Pepple, T., Boyes, R., Omar, R., Collinge, J., Stevens, J.M., Warrington, E.K., Rossor, M.N., Fox, N.C., 2008. Mapping the progression of progranulin-associated frontotemporal degeneration. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4, 455–460.
- 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.
- Sánchez-Cubillo, I., Periañez, J.A., Adrover-Roig, D., Rodríguez-Sánchez, J.M., Ríos-Lago, M., Tirapu, J., Barceló, F., 2009. Construct validity of the Trail Making Test: role of task-switching, working memory, inhibition/interference control, and visuospatial abilities. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 15, 438–450.
- Schmahmann, J.D., Pandya, D.N., Wang, R., Dai, G., D'Arceuil, H.E., de Crespigny, A.J., Wedeen, V.J., 2007. Association fibre pathways of the brain: parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. *Brain* 130, 630–653.
- 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.
- Whitwell, J.L., Jack, C.R., Baker, M., Rademakers, R., Adamson, J., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Parisi, J.F., Petersen, R.C., Dickson, D.W., Hutton, M.L., Josephs, K.A., 2007. Voxel-based morphometry in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with and without progranulin mutations. *Arch. Neurol.* 64, 371–376.
- Whitwell, J.L., Jack, C.R., Boeve, B.F., Senjem, M.L., Baker, M., Rademakers, R., Ivnik, R.J., Knopman, D.S., Wszolek, Z.K., Petersen, R.C., Josephs, K.A., 2009. Voxel-based morphometry patterns of atrophy in FTL with mutations in MAPT or PGRN. *Neurology* 72, 813–820.
- Whitwell, J.L., Jack, C.R., Parisi, J.E., Senjem, M.L., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Rademakers, R., Baker, M., Petersen, R.C., Dickson, D.W., Josephs, K.A., 2010. Does TDP-43 type confer a distinct pattern of atrophy in frontotemporal lobar degeneration? *Neurology* 75, 2212–2220.
- Zakzanis, K.K., Mraz, R., Graham, S.J., 2005. An fMRI study of the Trail Making Test. *Neuropsychologia* 43, 1878–1886.

THE MAPT p.A152T VARIANT COULD MODULATE NEUROPATHOLOGY OF GRANULIN-RELATED FRONTOTEMPORAL LOBAR DEGENERATION

Authors: Fermin Moreno MD^{1,2,3}, Begoña Indakoetxea MD^{1,2,3}, Myriam Barandiaran MD^{1,2,3}, Cristina Caballero MD⁴, Ana Gorostidi PhD^{2,3}, Francesc Calafell PhD⁵, Pascual Sánchez-Juan PhD⁶, Suzee Lee PhD⁷, Alazne Gabilondo MD^{2,3,8}, Mikel Tainta MD^{1,2,3}, Miren Zulaica^{2,3}, José Félix Martí-Massó PhD^{1,2,3,9}, Adolfo López de Munain PhD^{1,2,3,9}

¹ Cognitive Disorders Unit, Department of Neurology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain; ² Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institute Carlos III, Spain (<http://www.ciberned.es/>); ³ Neuroscience Area, Institute Biodonostia, San Sebastian, Spain; ⁴ Department of Pathology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, Spain; ⁵ Institute of Evolutionary Biology (CSIC-UPF), Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; ⁶ Neurology Service and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), ‘Marqués de Valdecilla’ University Hospital, University of Cantabria, Institute for Formation and Research of the Foundation ‘Marqués de Valdecilla’ (IFIMAV); ⁷ University of California, San Francisco, Memory and Aging Center, Department of Neurology; ⁸ Department of Neurology, Hospital de Bidasoa, Irun, Spain, ⁹Departement of Neurosciences, Universidad del País Vasco UPV-EHU, San Sebastian, Spain.

Abstract

Objective: To investigate the influence of the p.A152T *MAPT* variant on the clinical and neuropathologic phenotype of families of Basque descent carrying the c.709-1G>A *GRN* mutation.

Methods: Clinical phenotype (n=35), neuropsychological performance (n = 18) and plasma progranulin levels (n=23) were compared between patients with frontotemporal dementia carrying only the c.709-1G>A *GRN* mutation (*GRN*+/*A152T*-) and those carrying both the c.709-1G>A *GRN* mutation and the p.A152T *MAPT* variant (*GRN*+/*A152T*+). We also analyzed the haplotypes of the two largest families to estimate the age of the mutation. Seven had neuropathological studies.

Results: *GRN*+/*A152T*+ and *GRN*+/*A152T*- shared similar clinical and neuropsychological features and plasma progranulin levels. All seven autopsy cases (6 *GRN*+/*A152T*+, 1 *GRN*+/*A152T*-) showed the expected frontotemporal lobar degeneration with TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)-positive inclusions (FTLD-TDP) type A and all had a mild to moderate tau inclusion burden, with β -amyloid pathology absent in five cases and Alzheimer's disease pathology seen in two cases. The age of the mutation can be estimated with 95% probability at 0 to 49 generations ago.

Conclusions: The association of the p.A152T *MAPT* variant in *GRN* mutation carriers seems to have no influence on clinical or neuropsychological phenotype, but might influence neuropathology by conferring these patients a greater propensity for associated brain tau pathology.

INTRODUCTION

In 2008, our group described a geographic cluster of families with frontotemporal dementia (FTD) harboring the c.709-1G>A mutation in the progranulin gene (*GRN*) unique to the Basque Country¹. These families were more comprehensively clinically characterized in 2009². The clinical phenotype in our series is variable even within families, as has been described elsewhere for other *GRN* mutations^{3,4,5}. More recently, a rare variation in the microtubule-associated protein tau gene (*MAPT*) in exon 7 (p.A152T) has been linked to both sporadic FTD and Alzheimer's disease (AD) risk^{6,7}. In a study for the Spanish Genetic Dementia Consortium (DEGESCO), we found that *MAPT* p.A152T completely or partially co-segregated with *GRN* c.709-1G>A in these families. *MAPT* p.A152T was also present in nine of the fifteen families, co-segregating in 70.5% of the *GRN* mutation carriers⁸. The two genes, *GRN* and *MAPT*, are proximal on chromosome 17, located 1.7 Mb apart. The frequency of the *MAPT* p.A152T variant is very low in control groups (0.25-0.71%) and is overrepresented in patients with FTD (0.72-1.42%) and AD (0.56-1.02%) depending on the population studied^{6,8}. Although the p.A152T residue is distal to the domains considered responsible for microtubule interactions and aggregation, functional studies provide evidence for a functional role of the variant leading to tauopathy and axonal degeneration⁹.

The co-occurrence of an FTD-associated pathogenic mutation and a genetic FTD risk factor in a well-characterized group of patients allows us to study the influence of these genes on disease phenotype. The aim of this study was to explore and date the origin of both genes in these families and to compare the clinical and neuropathologic phenotype of those carrying both genetic variants with that of individuals carrying only the c.709-1G>A *GRN* mutation.

MATERIALS AND METHODS

Study population

All the patients in the study are from one of 18 families, all of Basque descent, that share a *GRN* mutation only found amongst these families. To analyze the prevalence of the p.A152T variant, we also included 507 unrelated healthy controls, 57 patients with Parkinson's disease carrying the R1441 or G2019S mutations in the leucine-rich repeat kinase 2 gene (*LRRK2*) and 20 patients with Steinert disease. The study was approved by the Donostia Hospital Ethics Committee and written informed consent was obtained from all participants.

Clinical evaluation

Thirty-five patients from 18 *GRN* families were included in the analysis. Clinical diagnoses were checked in a meeting of three experienced neurologists (FM, BI, and ALdM) and a neuropsychologist (MB) using clinical criteria^{10,11,12}. We included time from symptom onset to development of motor symptoms as a variable in the analysis. For 21 patients with available structural MRI, we classified each participant according to the presence or absence of asymmetry based on visual inspection.

Neuropsychological assessment

Eighteen patients had standardized neuropsychological assessment within the first year after symptom onset. Eighteen individuals were included in this analysis. The neuropsychological assessment consisted of a battery of cognitive tests. Overall cognitive status was assessed using the Mini-Mental State Examination (MMSE)¹³. Verbal episodic memory and design copying were tested using the Word List and the Constructional Praxis subtests from the Consortium to Establish a Registry for

Alzheimer's Disease (CERAD)¹⁴. We also included the Trail Making Test Parts A and B (TMT-A and -B)¹⁵ and the GERMICIDE neuropsychological protocol¹⁶ that comprises digit span forward and backward, semantic (animals) and phonetic verbal fluency, verbal comprehension and repetition, reasoning and unilateral and bilateral praxis tests.

Progranulin levels

We compared plasma progranulin levels that were available from 23 patients, 14 *GRN*+/*A152T*- and 9 *GRN*+/*A152T*+ carriers. Plasma samples were diluted 1:100 in the dilution buffer provided and levels of PGRN were measured in a duplicate set using a commercial ELISA assay (Progranulin [human] ELISA kit, AdipoGen, Inc, South Korea; ref AG-45A-0018YEK-KI01) according to the manufacturer's instructions. Recombinant human PGRN provided with the ELISA kit was used as a standard.

Genetic studies

Whole blood DNA was extracted using standard procedures. *MAPT* SNP rs143624519 genotyping was performed with a TaqMan allelic discrimination assay with inventoried probes (Applied Biosystems) and a LightCycler96 PCR system. Genotyping calls were made using LightCycler96 SW1.1 software (Roche).

To analyze the haplotypes and estimate the age of the mutation, we decided base the analysis on the two largest and most informative families, family 1 and 2, for which we had DNA samples from 21 and 26 individuals respectively. To examine the haplotype surrounding *GRN* mutation c.709-1G>A and *MAPT* SNP rs143624519, we typed six short tandem repeat (STR) markers spanning a region of 4.46 Mb on chromosome 17q21. All markers (D17S930, D17S1861, D17S950, D17S934, D17S920, and D17S1868) were amplified with one fluorescently labeled primer. PCR fragments were

analyzed on an ABI 3100 automated DNA analyzer and alleles were scored using the GeneMapper software (both from Applied Biosystems).

Haplotypes were resolved with PHASE 2.1^{17,18}. The age of the *GRN* mutation c.709-1G>A was estimated from Equation 28 in Walsh et al.¹⁹, considering a general STR mutation rate of $m=0.001$, together with an estimated recombination rate between the extreme markers in the haplotype of $r=0.022$ (from Kong et al.²⁰).

Neuropathologic analysis

Neuropathologic studies were carried out at Donostia University Hospital, the Neurological Tissue Bank of the Basque Biobank for Research (OEHUN), according to standardized protocols. The right half of the brain was sliced fresh and stored frozen at -80°C. The left half of the brain was fixed in 10% buffered formaldehyde for 3 to 4 weeks. The histological assessment was performed in 5- μ m-thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded blocks of tissue from areas of the left brain, namely, the frontal, temporal, parietal and occipital cortex, motor cortex, anterior and posterior cingulate gyrus, basal ganglia (including striatum and lenticular nuclei), nucleus basalis of Meynert, thalamus (anterior and medium nuclei, including subthalamic nucleus), pulvinar nuclei, amygdala, anterior and posterior hippocampus with parahippocampal gyrus, midbrain (with rostral and caudal substantia nigra), pons with locus coeruleus, medulla oblongata, cerebellar vermis, dentate nucleus of the cerebellum and olfactory bulb.

Sections of each tissue block were stained with hematoxylin and eosin, and additionally, Luxol fast blue staining was used on certain blocks. Automated immunohistochemistry was performed using primary antibodies on a Ventana BenchMark ULTRA slide staining system (Ventana Medical Systems, Tucson, USA). The Ventana staining

procedure included pretreatment with cell conditioner 1 (pH 8) or 2 (pH 6) and formic acid, depending on the antibody, followed by incubation with the corresponding antibody. This incubation was followed by treatment with ultraView Universal DAB. The primary antibodies used were: anti- β -amyloid (dilution 1:50, monoclonal, clone 12F4, Covance), anti-PHF tau (dilution 1/2000, monoclonal, clone AT8, Innogenetics), anti- α -synuclein (dilution 1:4000, monoclonal, clone LB509, Covance), anti-TARDBP (dilution 1:1000, monoclonal, clone 2E2-D3, Abnova), anti-ubiquitin (dilution 1:300, polyclonal, Dako), anti-PrP (dilution 1:100, monoclonal, clone 3F4, Millipore), anti-tau (4-repeat isoform RD4) (dilution 1:80, monoclonal, clone 1E1/A6, Millipore), anti-tau (3-repeat isoform RD3) (dilution 1:300, monoclonal, clone 8E6/C11, Millipore), neurofilament (pre-diluted, monoclonal, clone 2F11, Roche), and anti- α B-crystallin (dilution 1:500, polyclonal, ABN185, Millipore).

Statistical analysis

For comparisons between groups, categorical variables are described as absolute frequencies are compared with the χ^2 test or the Fisher exact test as appropriate, and continuous variables are compared with the Mann-Whitney's U test. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 17.0.0.

RESULTS

After the initial finding of an unexpectedly elevated number of subjects carrying the *MAPT* p.A152T variant in c.709-1G>A *GRN* mutation carriers, we screened other Basque populations for the variant, including healthy controls and genetic neurological diseases that are typically rare in other populations, but have a higher prevalence in the Basque population, including myotonic dystrophy type 1 (Steinert disease) and Parkinson's disease related to the *LRRK2* mutation²¹. We found seven carriers (1.4%) in

unrelated controls (n=507), one carrier out of 57 LRRK2 mutation carriers and no carriers in patients with Steinert disease (n=20). We also expanded the analysis to all related individuals in the *GRN* c.709-1G>A families who had participated in previous studies (n=102) and found that 37 out of 60 *GRN* mutation carriers also had the p.A152T variant (61.7% overall, 60% of affected carriers and 64% of presymptomatic carriers) and 5 out of 42 *GRN* non-carrier relatives (11.9%) also had the p.A152T variant (100% asymptomatic) (Table 1). Linkage disequilibrium analysis revealed that both genetic variants located in chromosome 17 were in partial linkage disequilibrium ($D'=0.78$; $r^2=0.46$).

Origin of the mutation

STR haplotype data were available for 5 GRN+ and 16 GRN- individuals in family 1 and for 12 GRN+ and 14 GRN- individuals in family 2. The *GRN* c.709-1G>A mutation was carried in the same haplotype by both families, comprising alleles 106, 91, 128, 185, A, 98 and 185 at the following loci: D17S930, D17S1861, D17S934, D17S950, rs14362519, D17S920 and D17S1868. Note that nucleotide A at rs143624519 corresponds to the T amino acid substitution at *MAPT* A152T. This haplotype was not found either in a sample of 18 control chromosomes (which all carried different haplotypes) or in the 39 non-carrier chromosomes from the affected families. Hence, it is more likely that these two families share the *GRN* c.709-1G>A mutation by descent than that it derives from two independent mutation events. Using Equation 28 from Walsh et al.¹⁹ (see Methods for details), the mutation was estimated with 95% probability to have arisen 0 to 49 generations ago.

In family 2, three GRN+/A152T- siblings were found. However, their STR haplotypes were consistent with a single recombination event between D17S950 and A152T in the

transmission of their mutation from their maternal grandfather to their mother, as can be reconstructed from other descendants of their maternal grandfather.

Clinical phenotype

We compared the clinical phenotype of FTD patients carrying the c.709-1G>A *GRN* mutation (*GRN*+/*A152T*-) (n=14) with those carrying both this *GRN* mutation and the *MAPT* p.A152T variant (*GRN*+/*A152T*+) (n=21). No significant differences were found between the groups in initial clinical diagnosis. Although the difference was non-significant, a diagnosis of CBS over the course of the disease was more frequent in the *GRN*+/*A152T*+ group. Age at symptom onset was not associated with the *MAPT* p.A152T genetic variant in *GRN* c.709-1G>A mutation carriers, with mean ages at onset of 60.95 ± 7.14 years in p.A152T-carriers and 61.36 ± 9.22 years in non-carriers (p=0.622). Time from symptom onset to development of motor symptoms was also similar in the two groups (Table 2).

Neuropsychological phenotype

Comparing the initial neuropsychological performance of patients carrying the *GRN* c.709-1G>A mutation (*GRN*+/*A152T*-) (n=9) with that of those carrying both this *GRN* mutation and the *MAPT* p.A152T variant (*GRN*+/*A152T*+) (n=8), no significant differences were found between the groups for any of the variables studied. We found a non-significant trend in the *GRN*+/*A152T*+ group to lower performance, particularly in frontal tests like digit span backward, TMT-A and TMT-B, and semantic and phonetic verbal fluency (Table 3).

Twelve of these patients underwent a further neuropsychological testing 1 year after the first assessment. Comparing changes in MMSE score in patients carrying the *GRN* c.709-1G>A mutation (*GRN*+/*A152T*-) and those carrying both this *GRN* mutation and

the *MAPT* p.A152T variant (*GRN*+/*A152T*+), we found that the *GRN*+/*A152T*+ group had a non-significant trend to more severe decline in MMSE score over 1 year.

Progranulin levels

The group carrying both variants (*GRN*+/*A152T*+) showed a non-significant trend to lower progranulin levels (mean: 54 ± 19.1 ng/ml) than those carrying only the *GRN* mutation (mean: 72.5 ± 31.4 ng/ml) (Mann-Whitney's U test: $p=0.201$). Interestingly, considering the distribution of serum progranulin levels, we observed that 5 out of 14 patients (35.7%) in the *GRN*+/*A152T*+ had levels of progranulin below 45 ng/ml and 11 out of 14 (78.6%) below 70 ng/ml, while these percentages were 0% and 55.5% respectively in the group carrying only the *GRN* mutation.

Neuropathologic phenotype

We performed neuropathologic assessment in seven patients, six from the *GRN*+/*A152T*+ and only one from the *GRN*+/*A152T*- group, which made formal comparisons difficult. All of them showed the characteristic histopathological features of frontotemporal lobar degeneration (FTLD) with ubiquitin-positive, tau-negative and TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)-positive inclusions (FTLD-TDP type A)^{21,22}. Two of the patients carrying both the *GRN* mutation and the *MAPT* variant also had Alzheimer's disease pathology.

After the discovery of the co-occurrence of the p.A152T variant in these families, a neuropathologist (MCC) performed semi-quantitative analysis of tau pathology in these brains, blind to the genetic status of the individuals. Results are summarized in Table 4. All of the autopsies showed mild to moderate tau pathology. These inclusions comprised neuropil threads (NTs), neurofibrillary tangles (NFTs), pretangles (PTs) and astrocytic inclusions, NTs and PTs being the most common. The amygdala, entorhinal and transentorhinal cortex and nucleus basalis of Meynert were consistently affected by

tau pathology. The striatum was usually more affected than the pallidum, and in the neocortex, the tau pathology was most prominent in the temporal lobe, followed by the frontal and occipital lobes. In most cases, except in the two with a diagnosis of Alzheimer's disease, these tau inclusions were not accompanied by β -amyloid pathology. One patient from the *GRN*⁺/*A152T*⁺ group received a diagnosis of unclassified tauopathy because, besides TDP-43 pathology, tau burden was unusually more diffuse and severe, with tau immunoreactivity in astrocytes, and the pattern did not fit a defined tauopathy.

Phenotype of GRN-negative p.A152T carriers

At the time of this study, none of the four *MAPT* p.A152T carriers who were negative for *GRN* c.709-1G>A had a history of neurodegenerative disease.

DISCUSSION

In this study, we describe the clinical and pathological features of a cluster of families that share the private c.709-1G>A *GRN* mutation and the p.A152T *MAPT* variant that has been described as a risk factor for AD and FTD-spectrum disorders. Across families, we have found individuals with both variants, while some carry only the c.709-1G>A *GRN* mutation and others only the p.A152T *MAPT* risk variant. Those carrying only the *MAPT* variant have not developed clinical symptoms.

In the families for which we have STR genotypes, it is clear that the c.709-1G>A *GRN* mutation results from a single event, in a haplotype background carrying A152T. This *MAPT* variant has been lost in some cases due to recombination. The c.709-1G>A *GRN* mutation can be estimated to have arisen at some time in the last 50 generations, that is, roughly 13 centuries.

This unexpected situation of partial co-segregation of two FTLN-related genetic variants in a regional cohort allows us to compare the clinical phenotype of individuals

carrying both variants (*GRN*+/*A152T*+) with those carrying only the *GRN* mutation (*GRN*+/*A152T*-). Both groups shared similar clinical and neuropsychological features, although the *GRN*+/*A152T*+ group had non-significant trends to a poorer performance in frontal-executive tests and more severe decline in MMSE score at 1 year. These results suggest that the p.*A152T* variant has a limited influence on clinical phenotype in these c.709-1G>A *GRN* families. Serum progranulin levels were not markedly different in the two groups, though those carrying both variants (*GRN*+/*A152T*+) tended to have lower progranulin levels. Whether this is an artifact of the small sample size or the p.*A152T* variant modifies progranulin levels requires further studies.

In contrast, the analysis of brain autopsies suggests an influence of the *MAPT* variant in the neuropathology of the disease. We found the FTLD-TDP type A pathology characteristic of *GRN* mutations and variable amounts of tau pathology, unusually high in one patient who also received a pathologic diagnosis of unclassifiable tauopathy and in two patients in whom tau pathology was accompanied by amyloid deposition and who received a pathologic diagnosis of Alzheimer's disease. Previous neuropathologic analysis of autopsies of individual patients carrying the p.*A152T* *MAPT* variant have shown different types of abnormal tau accumulation: NFTs, NTs, tufted astrocytes, and oligodendroglial coiled bodies, in different combinations and distributions, some fulfilling criteria for corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy²⁴, or pallidonigroluysian atrophy²⁵, while others were considered to be unclassifiable tauopathies²⁶. Although not systematically analyzed, some studies have suggested that there is no interaction between tau and TDP-43 pathologies in FTLD. Specifically, tau pathology is generally scant and restricted to the hippocampus and/or entorhinal cortex in most patients with FTLD-TDP²⁷. Moreover, it seems that individuals with FTLD associated with *GRN* mutations have a lower propensity for tau pathology than those

with other FTLD types, such as FTLD associated with *C9ORF72* mutations or sporadic FTLD-TDP^{27,28}. The unexpectedly high amount of tau pathology observed in our autopsies suggests that the p.A152T *MAPT* variant might have a pathogenic role in these patients.

Incomplete penetrance, phenotypic variability, apparently sporadic cases carrying pathogenic mutations and recent descriptions of double mutations²⁹⁻³⁴ point toward an oligogenic basis for FTLD. The oligogenic disease model implies that more than one genetic factor is involved in disease pathogenesis and could explain the incomplete penetrance and phenotypic variability that is seen in the majority of FTLD- and ALS-associated genes described in recent years, like *GRN*, *TARDBP* and *C9ORF72*.

One of strength of this study is that clinical and neuropsychological assessment was standardized and performed by the same medical team. Further, the finding of the coexistence of the p.A152T *MAPT* variant was made after this assessment, which reduces the risk of systematic bias. However, we should also acknowledge some limitations of the study. First, the relatively small sample makes it difficult to extract robust conclusions about the pathogenic nature of the p.A52T *MAPT* variant. Second, results are restricted to the specific context of these families of Basque descent with their unique genetic background. Nevertheless, we anticipate that in the coming years in-depth genetic analysis of families with an already identified pathogenic mutation will shed light on the mechanisms and potential modifiers of complex neurodegenerative diseases.

Acknowledgements

We are grateful for the generous contribution of the individuals who participated in the study. The Neuroscience Area of the Biodonostia Health Research receives funding from the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades

Neurodegenerativas (CIBERNED). We are grateful to Leyre Curto and Karmele Arnaiz for their invaluable administrative support.

References

1. López de Munain A, Alzualde A, Gorostidi A, et al. Mutations in progranulin gene: clinical, pathological, and ribonucleic acid expression findings. *Biol Psychiatry* 2008; 63: 946-52.
2. Moreno F, Indakoetxea B, Barandiaran M, et al. "Frontotemporoparietal" dementia: clinical phenotype associated with the c.709-1G>A *PGRN* mutation. *Neurology* 2009; 73: 1367-74.
3. Rademakers R, Baker M, Gass J, et al. Phenotypic variability associated with progranulin haploinsufficiency in patients with the common 1477C→T (Arg493X) mutation: an international initiative. *Lancet Neurol* 2007; 6: 857-68.
4. van Swieten JC, Heutink P. Mutations in progranulin (*GRN*) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2008; 7: 965-74.
5. Chen-Plotkin AS, Martínez-Lage M, Sleiman PM, et al. Genetic and clinical features of progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol* 2011; 68: 488-97.
6. Coppola G, Chinnathambi S, Lee JJ, et al. Evidence for a role of the rare p.A152T variant in *MAPT* in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer's diseases. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3500-12.

7. Lee SE, Tartaglia MC, Yener G, et al. Neurodegenerative disease phenotypes in carriers of *MAPT* p.A152T, a risk factor for frontotemporal dementia spectrum disorders and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2013; 27: 302-9.
8. Pastor P, Moreno F, Clarimón J, et al. MAPT H1 haplotype is associated with late-onset Alzheimer's disease risk in ApoEε4 noncarriers: results from the dementia genetics spanish consortium. *J Alzheimers Dis* 2015; 49: 343-52.
9. Fong H, Wang C, Knoferle J, et al. Genetic correction of tauopathy phenotypes in neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2013; 1: 226-34.
10. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011;134: 2456-77.
11. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011; 76: 1006-14.
12. Boeve BF, Lang AE, Litvan I. Corticobasal degeneration and its relationship to progressive supranuclear palsy and frontotemporal dementia. *Annals of Neurology* 2003; 54 (Suppl 5): S15-19.
13. Folstein MF, Folstein S, McHugh PR. "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-98.
14. Morris JC, Mohs RC, Rogers H, Fillenbaum G, Heyman A. CERAD: clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Psychopharmacol Bull* 1988; 24: 641-52.

15. Reitan, RM. Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. *Perceptual and motor skills* 1958; 8: 271-6.
16. Manubens JM, Barandiaran M, Martinez-Lage P, et al. Values of GERMICIDE neuropsychological protocol in a sample of normal subjects. *Neurologia* 2005; 20: 174-9.
17. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-89.
18. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 449-62.
19. Walsh B. Estimating the time to the most recent common ancestor for the Y chromosome or mitochondrial DNA for a pair of individuals. *Genetics* 2001; 158: 897-912.
20. Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, et al. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 2002; 31: 241-7.
21. Martí Massó JF, Zarranz JJ, Otaegui D, López de Munain A. Neurogenetic disorders in the Basque population. *Ann Hum Genet* 2015; 79: 57-75.
22. Mackenzie IR. The neuropathology and clinical phenotype of FTD with progranulin mutations. *Acta Neuropathol.* 2007; 114: 49-54.
23. Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, et al. A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 111-3.

24. Kara E, Ling H, Pittman AM, et al. The MAPT p.A152T variant is a risk factor associated with tauopathies with atypical clinical and neuropathological features. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 2231.e7-2231.e14.
25. Graff-Radford J, Whitwell JL, Dickson DW, Josephs KA. Pallidonigroluysian atrophy associated with p.A152T variant in MAPT. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19: 838-41.
26. Kovacs GG, Wöhrer A, Ströbel T, Botond G, Attems J, Budka H. Unclassifiable tauopathy associated with an A152T variation in MAPT exon 7. *Clin Neuropathol* 2011; 30: 3-10.
27. Robinson AC, Thompson JC, Weedon L, et al. No interaction between tau and TDP-43 pathologies in either frontotemporal lobar degeneration or motor neurone disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40: 844-54.
28. Bieniek KF, Murray ME, Rutherford NJ, et al. Tau pathology in frontotemporal lobar degeneration with C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 289-302.
29. Chiò A, Restagno G, Brunetti M, et al. ALS/FTD phenotype in two Sardinian families carrying both C9ORF72 and TARDBP mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 730-3.
30. Kaivorinne AL, Moilanen V, Kervinen M, et al. Novel TARDBP sequence variant and C9ORF72 repeat expansion in a family with frontotemporal dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2014; 28: 190-3.

31. King A, Al-Sarraj S, Troakes C, et al. Mixed tau, TDP-43 and p62 pathology in FTLD associated with a *C9ORF72* repeat expansion and p.Ala239Thr *MAPT* (tau) variant. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 303-10.
32. Lashley T, Rohrer JD, Mahoney C, et al. A pathogenic progranulin mutation and *C9orf72* repeat expansion in a family with frontotemporal dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40: 502-13.
33. Mignarri A, Battistini S, Tomai Pitinca ML, et al. Double trouble? Progranulin mutation and *C9ORF72* repeat expansion in a case of primary non-fluent aphasia. *J Neurol Sci* 2014; 341: 176-8.
34. Van Blitterswijk M, Baker MC, DeJesus-Hernandez M, et al. *C9ORF72* repeat expansions in cases with previously identified pathogenic mutations. *Neurology* 2013; 81: 1332-41.

Table 1. Distribution of MAPT p.A152T and GRN c.709-1G>A mutation frequencies

	Symptomatic (n)	Presymptomatic/Asymptomatic (n)	Total (n)
<i>GRN+/A152T+</i>	21	16	37
<i>GRN+/A152T-</i>	14	9	23
<i>GRN-/A152T+</i>	0	5	5
<i>GRN-/A152T-</i>	0	37	37
Total	35	67	102

GRN+: carrier of the *GRN* c.709-1G>A mutation; *GRN-*: non-carrier of the *GRN* c.709-1G>A mutation; *A152T+*: carrier of the *MAPT* p.A152T variant; *A152T-*: non-carrier of the *MAPT* p.A152T variant.

Table 2. Comparison of demographic and clinical variables between groups.

	GRN+/A152T+	GRN+/A152T-	<i>p</i>
Sex (Male/Female)	6/15	7/7	0.288
Age of onset (years)	60.95 ± 7.14	61.36 ± 9.22	0.622
Initial diagnosis	bvFTD (10)	bvFTD (9)	0.977
	naPPA (5)	naPPA (2)	
	AD (3)	AD (2)	
	CBS (1)	CBS (0)	
	Others (2)	Others (1)	
CBS diagnosis over the disease course (yes/no)	12/9	5/9	0.305
Asymmetry in magnetic resonance image (yes/no)	6/5	7/3	0.659
Time to onset of motor symptoms (years)	3.06 ± 1.25	3.1 ± 1.66	0.843

AD: Alzheimer's disease; bvFTD: behavioral variant frontotemporal dementia; CBS: corticobasal syndrome; naPPA: non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia.

Table 3. Comparison of neuropsychological performance between groups.

	<i>GRN+/A152T+</i>	<i>GRN+/A152T-</i>	<i>p</i>
<i>MMSE</i>	23.63 ± 4.37	24.50 ± 3.95	0.66
<i>Digit span forward</i>	4.75 ± 0.71	4.6 ± 0.70	0.66
<i>Digit span backward</i>	2.38 ± 1.30	3.10 ± 0.74	0.15
<i>TMT-A</i>	100.8 ± 50.63	76.83 ± 26.28	0.34
<i>TMT-B</i>	200 ± 36.74	180.17 ± 73.88	0.60
<i>Semantic verbal fluency</i>	9.88 ± 4.02	11.30 ± 4.55	0.50
<i>Phonetic verbal fluency</i>	3.67 ± 3.08	7.33 ± 6.25	0.23
<i>Reasoning</i>	5.13 ± 3.48	4.30 ± 2.11	0.54
<i>Verbal comprehension</i>	5.63 ± 0.74	5.89 ± 0.33	0.35
<i>Repetition</i>	9.88 ± 0.35	9.89 ± 0.33	0.93
<i>Unilateral praxis</i>	8.63 ± 3.16	9.78 ± 0.44	0.34
<i>Bilateral praxis</i>	6.13 ± 2.29	6.44 ± 1.74	0.75
<i>CERAD Word List 1</i>	2.25 ± 1.39	2.70 ± 0.95	0.43
<i>CERAD Word List 2</i>	3.63 ± 1.51	4.10 ± 1.10	0.45
<i>CERAD Word List 3</i>	4.75 ± 1.98	5.20 ± 2.10	0.65
<i>CERAD Word List Recall</i>	3.2 ± 1.55	2.37 ± 1.99	0.34
<i>CERAD Word List Recognition</i>	17.50 ± 1.93	16.30 ± 3.56	0.38
<i>CERAD Constructional Praxis</i>	9.13 ± 3.23	9.30 ± 1.83	0.89
<i>MMSE score change at 1 year</i>	-5.17 ± 3.76	-3.67 ± 2.81	0.45

CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; MMSE: Mini-Mental State Examination; TMT: Trail Making Test.

Table 4. Semi-quantitative analysis of tau pathology in individual autopsies

	Tau pathology	Frontal cortex	Temporal cortex	Occipital cortex	Striatum	Lenticular nucleus	Thalamus	Nucleus basalis of Meynert	Amygdala	Entorhinal cortex	Substantia nigra	Locus coeruleus	Olfactory bulb
FTLD-TDP type A (57 years, GRN+/p.A152T-)	NTs	++	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
	PTs	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
	NFTs	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	NPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FTLD-TDP type A (64 years, GRN+/p.A152T+)	NTs	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	PTs	+	+	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-
	NFTs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FTLD-TDP type A (70 years, GRN+/p.A152T+)	NTs	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	PTs	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
	NFTs	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	NPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FTLD-TDP type A (76 years, GRN+/p.A152T+)	NTs	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	PTs	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	NFTs	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	NPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FTLD-TDP type A + unclassifiable tauopathy (75 years, GRN+/p.A152T+)	NTs	+	+++	+	+	++	+	+++	+++	+++	++	++	+
	PTs	+	+++	-	++	++	-	+++	+++	+++	-	++	+
	NFTs	-	+++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	-
	NPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FTLD-TDP type A + Alzheimer's disease (71 years, GRN+/p.A152T+)	NTs	+	++	-	+	-	-	+	-	+	+	++	-
	PTs	-	+	-	+	-	+	+	++	+	-	+++	-
	NFTs	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	NPs	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FTLD-TDP type A + Alzheimer's disease (76 years, GRN+/p.A152T+)	NTs	+	+++	+	+	+	+	+	+++	+++	+	++	+
	PTs	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	NFTs	+	++	-	-	-	+	++	++	+++	-	+	-
	NPs	-	+	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-
	ASTs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ASTs: tau-positive astrocytic inclusions; NFTs: neurofibrillary tangles; NPs: neuritic plaques; NTs: neuropil threads; PTs: pretangles. +: mild density, ++: moderate density; +++: high density.

