



Afasia primàries progressives

Caracterización clínica y marcadores biológicos

Silvia Gil Navarro

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Afasia primarias progresivas

Caracterización clínica y marcadores biológicos

Doctorando

Silvia Gil Navarro

Directores

Raquel Sánchez del Valle Díaz

Albert Lladó Plarrumaní

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE NEUROCIÈNCIES CLÍNiques I
EXPERIMENTALS**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

2013

El presente trabajo ha sido financiado a través de diversos proyectos concedidos a la Dra. Raquel Sánchez-Valle (GE Healthcare BioSciences, S.A.), Dr. José Luis Molinuevo (Instituto de Salud Carlos III, CSD2010-00045), y al Dr. Albert Lladó (Instituto de Salud Carlos III, PI11/00234).

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Dra. RAQUEL SÁNCHEZ DEL VALLE DÍAZ, doctora en Medicina por la Universidad de Barcelona y el Dr. ALBERT LLADÓ PLARRUMANÍ, doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN

Que la memoria titulada “*Afasia primaria progresiva: Caracterización clínica y marcadores biológicos*”, presentada por SILVIA GIL NAVARRO, se ha realizado bajo nuestra supervisión y consideramos que reúne los requisitos necesarios para ser defendida ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona.

Firmado,

Raquel Sánchez del Valle Díaz

*Unidad de Alzheimer y otros trastornos
cognitivos*

Servicio de Neurología

Hospital Clínic de Barcelona

Albert Lladó Plarrumaní

*Unidad de Alzheimer y otros trastornos
cognitivos*

Servicio de Neurología

Hospital Clínic de Barcelona

Barcelona, 1 de julio de 2013

A mi familia

Agradecimientos

Quiero dedicar la finalización de esta tesis doctoral a todas aquellas personas que me han acompañado durante esta etapa de mi vida. Sin su apoyo científico y humano nunca hubiera podido llevar a cabo este trabajo de investigación.

En primer lugar, agradezco a todos los pacientes de la Unidad de Alzheimer del Hospital Clínic de Barcelona su participación desinteresada en los estudios realizados.

Me gustaría mostrar mi gratitud a mis directores de tesis, Raquel y Albert, por la dedicación que siempre me han prestado. Gracias por vuestros consejos y valiosa orientación y por introducirme en el ámbito investigador de las demencias. También quiero agradecer a todas las personas de la Unidad de Alzheimer del Hospital Clínic su cariñosa acogida cuando empecé esa nueva etapa laboral junto a ellos. Gracias, de forma especial, a Bea, Judith, Rosa y Cris, por ofrecerme su amistad y por tantas risas y buenos momentos compartidos.

Deseo también mostrar mi agradecimiento a Nuria, Magda y todo el personal del hospital de día. Gracias por vuestra disponibilidad y compartir vuestros conocimientos y valioso trabajo conmigo. Mi mención especial a los pacientes afásicos que participaban en las sesiones de logopedia. Gracias por abrirme las puertas de vuestras vidas y por enseñarme que, muchas veces, un gesto vale más que mil palabras... A vosotros, mi más profundo respeto y reconocimiento.

Mi gratitud también para Ellen, por su apoyo desinteresado. Gracias a mis ex-compañeros de despacho, Claustre, Judith, Lola, María y Mircea, por los momentos compartidos y todo lo que aprendí de vosotros. También quiero agradecer a Sergi su ayuda e interés.

Quiero mostrar mi gratitud de forma especial con mis padres por todo el cariño y apoyo que siempre me han dado. Sin su aliento, ejemplo y tesón este trabajo no sería realidad. Gracias por enseñarme que con esfuerzo no hay imposibles y que la vida es para los valientes. También quiero expresar mi gratitud a mis hermanos, María y Luis, que son todo para mí, y al resto de mi familia, por animarme a continuar, estar siempre a mi lado y ocupar un lugar especial en mi vida.

A mis amigas, por sus ánimos constantes y por hacerme sentir una persona privilegiada. A Angelito, por cuidar tan bien de mí.

A Vicente, por hacerme creer que era posible y estar incondicionalmente a mi lado. Le doy las gracias por su valentía y los esfuerzos que ha hecho durante este tiempo y, principalmente, por hacerme feliz. Sabes que este trabajo también te pertenece.

INDICE

I.- GLOSARIO DE ABREVIATURAS	11
II.- INTRODUCCIÓN	15
1. Definición de la afasia primaria progresiva y antecedentes históricos	17
2. El diagnóstico y la caracterización clínica de la afasia primaria progresiva	19
3. Variantes clínicas de la afasia primaria progresiva y criterios diagnósticos	22
4. Epidemiología y evolución clínica de la afasia primaria progresiva y sus variantes	26
5. Correlación clínico-patológica de las variantes clínicas de afasia primaria progresiva	28
6. Biomarcadores diagnósticos	31
III.- HIPÓTESIS	39
IV.- OBJETIVOS	43
V.- MATERIAL Y MÉTODOS	47
VI.- RESULTADOS	53
1. Neuroimaging and biochemical markers in the three variants of primary progressive aphasia. <i>Dementia and Geriatric Cognitive Disorders</i> 2013;35:106-117	55
2. Serum progranulin levels in patients with frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease: detection of GRN mutations in a Spanish cohort. <i>Journal of Alzheimer's Disease</i> 2012;31:581-591	69
3. Decreased striatal dopamine transporter uptake in progressive non-fluent aphasia. <i>European Journal of Neurology</i> 2013. May 17 [Epub ahead of print]	83
VII.- DISCUSIÓN	94
VIII.- CONCLUSIONES	108
IX.- BIBLIOGRAFÍA	112

I. Glosario de abreviaturas

A β 1-42 Isoforma de 42 aminoácidos de la proteína beta-amiloide

ADL Actividades de la vida diaria (*Activities of Daily Living*)

APOE Gen de la apolipoproteína E

APP Afasia primaria progresiva

APNF Afasia progresiva no-fluente

BDAE Batería de Boston para el diagnóstico de la afasias (*Boston Diagnosis Aphasia Examination battery*)

BNT Test de denominación de Boston (*Boston Naming Test*)

CERAD Consorcio para el establecimiento de un registro de la enfermedad de Alzheimer (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*)

CHMP2B Gen de *charged multivesicular body protein 2b*

C9ORF72 Chromosome 9 open reading frame 72

DCB Degeneración córtico-basal

DCL Demencia con cuerpos de Lewy

DLFT Degeneración lobular frontotemporal

DFT-ELA Demencia frontotemporal asociada a esclerosis lateral amiotrófica

DS Demencia semántica

DSHHD Demencia sin hallazgos histopatológicos distintivos

EA Enfermedad de Alzheimer

ELA Esclerosis lateral amiotrófica

ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

FUS Gen de *fused in sarcoma*

GRN Gen de progranulina

LCR Líquido cefalorraquídeo

MMSE Mini examen del estado mental (*Mini Mental State Examination*)

PALS Escala de lenguaje para la afasia progresiva (*Progressive Aphasia Language Scale*)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PET Tomografía de emisión de positrones (*Positron Emission Tomography*)

PSP Parálisis supranuclear progresiva

P-tau₁₈₁ Tau fosforilada en el epitopo treonina 181

RM Resonancia magnética

SCB Síndrome córtico-basal

SPECT Tomografía simple de emisión de positrones (*Single Photon Emission Computed Tomography*)

SPSP Síndrome de parálisis supranuclear progresiva

TARDBP Gen de *transactivation response DNA-binding protein*

T-tau Tau total

UPDRS Escala unificada para la evaluación de la enfermedad de Parkinson (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*)

VBM Morfometría basada en voxel (*Voxel Based Morphometry*)

vcDFT o DFT Variante conductual de demencia frontotemporal

VCP Gen de *valosin-containing protein*

II. Introducción

1. Definición de la afasia primaria progresiva y antecedentes históricos

La afasia primaria progresiva (APP) es un trastorno neurodegenerativo, inicialmente focal, caracterizado por una alteración aislada del lenguaje. Su curso evolutivo, acorde con su naturaleza neurodegenerativa, es insidiosamente progresivo y otros dominios extralingüísticos se afectan con la progresión de la enfermedad (Mesulam, 2003). Además, los pacientes pueden desarrollar síntomas conductuales o trastornos motores, ya sea bajo el fenotipo clínico de un síndrome parkinsoniano atípico o el de una enfermedad de motoneurona. Sin embargo, el lenguaje continúa siendo el dominio más alterado y el que progresa más rápidamente durante todo el curso evolutivo de la enfermedad (Libon et al., 2009).

Arnold Pick (Pick, 1892) fue el primer autor que realizó, hace más de un siglo, una descripción neuropatológica, de un paciente con un declinar progresivo del lenguaje, aunque en el contexto de un importante trastorno conductual. El paciente, varón de 71 años, inicialmente presentó una afasia sensorial transcortical y su estudio neuropatológico reveló una atrofia circunscrita del lóbulo temporal y los dos tercios posteriores del lóbulo frontal del hemisferio izquierdo.

Un año después, Sérieux (Sérieux, 1893) describió el primer paciente con un trastorno aislado del lenguaje, de inicio a los 47 años, caracterizado por dificultad para entender palabras. Su estudio neuropatológico reveló una severa atrofia bitemporal (Dejerine, 1897). A principios del siglo XX se siguieron publicando casos clínicos con una alteración del lenguaje como síntoma inicial y relativamente aislado de un proceso neurodegenerativo subyacente (Franceschi, 1908; Mingazzini, 1914). Curiosamente, el primer paciente que describió Alois Alzheimer, también por aquel entonces, presentó, entre otros síntomas cognitivos, una afasia y se sugirió que la afectación del lenguaje también podría ser uno de los síntomas de la demencia que lleva el nombre de este autor (Alzheimer, 1907). Actualmente se reconoce que la enfermedad de Alzheimer (EA) tiene presentaciones focales y puede manifestarse inicialmente como un trastorno aislado, no sólo del lenguaje, sino también, disejecutivo o visuoperceptivo/visuoespacial (Alladi et al., 2007).

El renaciente interés en las demencias con afectación del lenguaje surgió en 1982, tras la descripción de seis casos clínicos realizada por el doctor Marcel Mesulam (Mesulam, 1982). Cinco de estos pacientes tenían una afasia anómica progresiva con una atrofia

selectiva perisilviana izquierda en la resonancia magnética (RM). En esta publicación, estos pacientes fueron presentados como una afasia lentamente progresiva (slowly progressive aphasia). Sin embargo, posteriormente, este mismo autor acuñó el actual término de APP para referirse a este síndrome clínico y diferenciarlo de otras demencias, principalmente de la EA (Mesulam, 1987).

Los pacientes descritos inicialmente por el doctor Mesulam, además de presentar una llamativa anomia, tenían un lenguaje espontáneo hipofluente y cometían frecuentes errores gramaticales. Esta forma de manifestarse un trastorno del lenguaje fue más tarde presentada como una afasia progresiva no-fluente (APNF) por el doctor Murray Grossman (Grossman et al., 1996). Este autor describió tres pacientes con un lenguaje empobrecido gramaticalmente y una atrofia fronto-temporal izquierda en la RM. El estudio neuropatológico, según la clasificación vigente en aquel momento, fue de demencia sin hallazgos histopatológicos distintivos (DSHHD).

En los años setenta, la profesora Elizabeth Warrington describió tres pacientes con una pérdida aislada y progresiva del conocimiento del significado de las palabras, atribuida a una afectación selectiva de la memoria semántica (Warrington, 1975). Esta condición fue igualmente descrita por otros autores (Basso et al., 1988) y relacionada con el síndrome clínico de APP (Poeck y Luzzatti, 1988). Posteriormente, la doctora July Snowden la renombró como demencia semántica (DS) (Snowden et al., 1989). Una caracterización clínica y anatómica más completa de la DS llegó unos años más tarde de la mano del doctor John Hodges (Hodges et al., 1992). Este autor describió cinco pacientes con una severa anomia y alteración de la comprensión de palabras aisladas cuya RM mostró una atrofia selectiva temporal izquierda.

Años más tarde, la APNF y la DS se incluyeron entre los síndromes clínicos de presentación de la degeneración lobular frontotemporal (DLFT), estableciéndose criterios diagnósticos de consenso para su uso en investigación (Neary et al., 1998). También en los noventa, se describió un nuevo síndrome clínico relacionado con la APP: la afemia progresiva o anartria lentamente progresiva (Cohen et al., 1993; Broussolle et al., 1996), un trastorno de la programación motora del habla, sin ningún otro dominio lingüístico o extralingüístico alterado inicialmente. La neuroimagen estructural y funcional reveló una afectación frontal postero-inferior del hemisferio izquierdo. Este mismo trastorno, pero bajo el término de apraxia del habla, también se describió en casos con confirmación neuropatológica de degeneración córtico-basal (DCB) (Rosenfield et al., 1991). En algunos pacientes con PNFA, la descripción de un lenguaje espontáneo laborioso y distorsionado, también sugería una apraxia del habla asociada (Hodges y Patterson, 1996).

Posteriormente, Kertesz y col intentaron mejorar la caracterización de la afectación del lenguaje en la EA y diferenciar los pacientes con APP y EA basándose en las características del lenguaje, cognitivas y de neuroimagen estructural (Kertesz et al., 2003). En su estudio, describieron una forma de APP “logopénica”, caracterizada por dificultad para evocar palabras con conservación de los aspectos sintácticos y fonéticos del lenguaje. Los autores sugirieron que, aunque la diferenciación de la APP en los subtipos afémico, agramático, semántico y logopénico era de utilidad clínica, alguno de ellos podría representar distintos momentos evolutivos de la misma enfermedad.

El grupo de la doctora María Luisa Gorno-Tempini presentó una mejor descripción de la variante logopénica poco tiempo después (Gorno-Tempini et al., 2004). En su trabajo analizaron las características del lenguaje, cognitivas y la atrofia cerebral de las tres principales variantes de APP (APNF, DS y afasia logopénica). Sin embargo, la explicación patofisiológica de los síntomas neurolingüísticos de cada variante de APP no se analiza en dicho trabajo y todavía hoy resulta controvertida.

Otros grupos de investigación (Rohrer et al., 2008a; Deramecourt et al., 2010) han descrito otras variantes clínicas de APP de uso más restringido en la literatura.

En los últimos años se han realizado múltiples estudios de correlaciones clínico-radiológicas y clínico-patológicas de los síntomas neurolingüísticos y las variantes clínicas de APP. Su objetivo ha sido estudiar la fisiopatología de los mismos e identificar biomarcadores que predigan las alteraciones bioquímicas subyacentes en cada variante clínica de APP. Los resultados de estos estudios se explicarán con más detalle en apartados posteriores.

2. El diagnóstico y la caracterización clínica de la afasia primaria progresiva

El diagnóstico del síndrome clínico de APP requiere, que el síntoma inicial sea una alteración aislada del lenguaje, ya sea en su expresión (oral o escrita) y/o en la comprensión (auditiva o lectora) (Mesulam, 2001). Además, se deben descartar otras entidades que también ocasionan afasia (ictus, tumores, traumatismos craneoencefálicos...) así como trastornos psiquiátricos u otras demencias con afectación de otros dominios cognitivos y/o conductual. Según se especifica en los actuales criterios diagnósticos, los casos de

disfonía aislada o alteraciones del lenguaje repetitivas, como la palilalia o la ecolalia, deben excluirse del diagnóstico por no considerarse alteraciones primariamente lingüísticas (Gorno-Tempini et al., 2011). Por otro lado, las actividades de la vida diaria (ADL) han de estar preservadas en los estadios iniciales de la APP, con la excepción de aquellas que pueden estar afectadas directamente por la alteración del lenguaje como, por ejemplo, el uso del teléfono.

La realización de test neuropsicológicos estandarizados que caractericen el déficit del lenguaje, es imprescindible para el diagnóstico de APP (Weintraub et al., 1990; Mesulam, 2001). Sin embargo, muchos de éstos se basan en instrucciones y en respuestas verbales y su interpretación debe ser cautelosa para no concluir erróneamente que algunos dominios extralingüísticos están afectados. Por ejemplo, aunque la APP puede afectar la memorización de listas de palabras o la resolución de determinadas tareas, los pacientes no suelen tener problemas recordando acontecimientos diarios o realizando sus actividades cotidianas, indicando que tanto la memoria episódica como las funciones ejecutivas están intactas (Wicklund et al., 2007).

La mayoría de los pacientes con APP manifiestan como síntoma inicial dificultad para encontrar la palabra adecuada, un síntoma de causa heterogénea -pues depende de diversos procesos cognitivos- y que entraña un reto diagnóstico. En primer lugar, se debe intentar clarificar a qué exactamente se refiere el paciente o el familiar al manifestar dificultad para “encontrar” las palabras. Frecuentemente, esta expresión es utilizada para referirse, por ejemplo, a una dificultad para “acordarse” de los nombres de personas, síntoma relacionado con la alteración de la memoria episódica. Por el contrario, el problema subyacente a la queja de dificultad para encontrar las palabras es un defecto primariamente lingüístico. Igualmente, es importante contextualizar este síntoma dentro del nivel educativo o habilidades cognitivas premórbidas de cada individuo.

Los pacientes con APP tienen habitualmente un adecuado insight y capacidad de razonamiento. En muchas ocasiones, antes de que los déficits sean objetivos y cuantificables, es el propio paciente quien es consciente de sus dificultades. Este estadio “prodrómico” de la enfermedad puede durar hasta un año (Rogalski y Mesulam, 2009). Conforme la enfermedad evoluciona, debido a sus importantes limitaciones comunicativas, los pacientes con APP se pueden ver progresivamente desplazados de la práctica de determinadas actividades físicas o intelectuales y muchos de ellos desarrollan un síndrome depresivo. De hecho, la evaluación de la escala geriátrica de depresión en pacientes con APP, mostró que la mayoría puntuaban en el ítem de aislamiento social (Banks et al., 2006). Por otro lado, la cantidad de síntomas depresivos relatados por los pacientes depresivos con APP,

correlaciona positivamente con la severidad de la anomia en la evaluación neuropsicológica (Medina y Weintraub, 2007). Dado que la integridad psicológica de estos pacientes puede verse afectada, es aconsejable, por tanto, una valoración de síntomas neuropsiquiátricos y tratamiento antidepressivo cuando sea necesario.

Durante más de dos décadas los pacientes con APP se clasificaron de forma dicotómica entre afasia “no fluente” (o APNF) y afasia “fluente” (o DS), de forma análoga a la clasificación de las afasias de etiología vascular en los tradicionales subtipos “no fluente” y “fluente” (Goodglass y Kaplan, 1983). Sin embargo, el término “fluencia”, denota una tarea multidimensional y abarca aspectos diversos como la longitud de las frases, la estructura sintáctica, la agilidad articulatoria, la prosodia (Goodglass et al., 1964; Hillis, 2007) o las pausas de búsqueda para encontrar la palabra adecuada (Gorno-Tempini et al., 2004). La “fluencia”, además, varía a lo largo del curso evolutivo de la APP (Kertesz et al., 2003) y también lo hace según el tipo de tarea que se le pida realizar al paciente. En conclusión, aunque aludir a la “fluencia” del lenguaje parezca útil a primera vista a nivel descriptivo, este término supone una simplificación de una amplia fenomenología clínica y es potencialmente erróneo, en tanto que difícilmente cuantificable, a la hora de categorizar un trastorno del lenguaje.

La mejor forma de describir un trastorno del lenguaje es caracterizar todas las variables que lo componen:

1. La capacidad para iniciar una conversación y generar un mensaje.
2. El contenido conceptual del mensaje emitido.
3. El vocabulario empleado y la habilidad de denominar objetos a partir de descripciones verbales o al visualizarlos en una lámina.
4. La comprensión de palabras aisladas y de frases.
5. La estructura gramatical del mensaje y su aspecto fonológico.
6. La capacidad para repetir sílabas aisladas, palabras y frases.
7. La programación motora del habla (iniciación, errores fonéticos, distorsiones, prolongación de los sonidos, autocorrecciones y cambios en la prosodia).
8. La lectura.
9. La escritura.
10. La capacidad de deletrear.

La actual clasificación diagnóstica de las variantes de APP, como se explicará a continuación, está basada en la identificación de la presencia o ausencia de determinadas variables neurolingüísticas para cada variante (Gorno-Tempini et al., 2011). El grupo del profesor Hodges, siguiendo estas directrices, desarrolló la escala de lenguaje para la afasia progresiva (Progressive Aphasia Language Scale, PALS), una escala que identifica las características neurolingüísticas fundamentales para subclasificar correctamente a los pacientes con APP (Leyton et al., 2011). La aplicación de esta escala condujo a la elaboración de un algoritmo diagnóstico de la APP basado en cuatro características claves: comprensión de palabras aisladas, agramatismo, apraxia del habla y repetición de frases. En 44 de los 47 pacientes (94%) con APP evaluados con la PALS hubo concordancia entre el diagnóstico clínico obtenido mediante este sencillo algoritmo y el diagnóstico clínico emitido por un neurólogo especialista en las APP basándose en los actuales criterios diagnósticos.

3. Variantes clínicas de la afasia primaria progresiva y criterios diagnósticos actuales.

La mayoría de los autores, basándose en las características neurolingüísticas citadas anteriormente y del lenguaje espontáneo, coinciden en identificar tres variantes principales de APP: la APNF, la DS y la afasia logopénica. Sin embargo, otras variantes también han sido ampliamente descritas (Costello y Warrington, 1989; Silveri et al., 2003; Gallassi et al., 2011; Pérez et al., 2013). Así, el grupo del University College of London, propuso clasificar la APP en ocho síndromes clínicos: afasia dinámica, disartria progresiva, apraxia del habla progresiva, APNF, anomia progresiva, afasia logopénica, afasia mixta progresiva y DS (Rohrer et al., 2008a). Por su parte, el grupo francés del Memory Clinic de Lille, clasificó una cohorte de APP con confirmación neuropatológica en seis síndromes clínicos diferentes: anartria progresiva, afasia agramatical progresiva, afasia logopénica progresiva, jergafasia progresiva, demencia semántica típica y demencia semántica atípica. Este grupo estableció además una correlación entre cada subtipo clínico de APP con la proteinopatía subyacente correspondiente (Deramecourt et al., 2010).

Los sucesivos intentos de agrupar la APP en subtipos clínicos identificables no han de considerarse meramente descriptivos. Su finalidad última es identificar mediante características clínicas el substrato neuropatológico subyacente en cada variante, es decir, la enfermedad que causa los síntomas y con ello, establecer un tratamiento y pronóstico

más certeros. Sin embargo, este objetivo, aunque resulta posible en determinados casos individuales, entraña varias dificultades. Por un lado, algunos pacientes presentan características clínicas mixtas, solapándose rasgos lingüísticos de más de una variante de APP. Además, estudios de correlación clínico-patológica, evidencian diversidad de patrones anatómicos e histopatológicos en cada una de estas variantes (Kertesz et al., 2005; Knibb et al., 2006; Mesulam et al., 2008). Otra dificultad radica en las diferentes terminologías utilizadas por los distintos grupos de investigación, pues la ausencia de una clasificación universalmente aceptada dificulta la comparación de resultados y la interpretación de los estudios de neuroimagen y neuropatológicos de cada centro investigador.

En 2011, un grupo de expertos internacionales en APP, consensuaron unos criterios clínicos de investigación comunes para el diagnóstico de las tres principales variantes de APP: la variante no fluente/agramatical (APP-vnf, anteriormente APNF), la variante semántica (APP-vs, anteriormente DS) y la variante logopénica (APP-vl o variante fonológica) (Gorno-Tempini et al., 2011). Los criterios diagnósticos clínicos de las tres variantes se resumen en la tabla 1.

La APP-vnf se caracteriza por agramatismo y/o una apraxia del habla. El agramatismo se manifiesta inicialmente en la omisión de morfemas gramaticales. Conforme la enfermedad evoluciona, las frases se acortan y el lenguaje se vuelve telegráfico hasta que los pacientes acaban finalmente mutistas. La apraxia del habla, un trastorno de la programación motora del habla, ocasiona frecuentes errores (parafasias) fonéticos, consistentes en distorsiones, deleciones, sustituciones, inserciones o transposiciones de los sonidos (Ogar et al., 2005; Ogar et al., 2007). Los pacientes realizan sucesivas autocorrecciones, pues son plenamente conscientes de que los sonidos emitidos son defectuosos e intentan corregirlos. De la misma forma, el ritmo, la acentuación y entonación del habla, es decir, la prosodia, también está afectada. Estas características hacen que el mensaje transmitido sea difícil de entender para el interlocutor. Por otra parte, en la APP-vnf también hay una afectación de la codificación fonológica y los pacientes pueden cometer errores (parafasias) fonológicos. Típicamente estos pacientes se benefician de pistas fonéticas en la evaluación formal del lenguaje, es decir, de que el examinador desvele la letra inicial de la palabra diana (Rohrer et al., 2008a).

Algunos estudios han señalado una mayor afectación en la denominación de verbos *versus* sustantivos en la APP-vnf (Hillis et al., 2002). El mecanismo subyacente, objeto de debate, parece ser una doble afectación a nivel lingüístico o primariamente verbal, como a un nivel más amplio semántico/conceptual, que afectaría al conocimiento de acciones *versus* objetos (Bak et al., 2003).

Tabla 1. Criterios clínicos diagnósticos de las tres variantes de APP.

	APP-vnf	APP-vs	APP-vl
Criterios mayores	<p>Uno de los dos siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Agramatismo 2. Apraxia del habla 	<p>Dos de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Afectación de la denominación por confrontación visual 2. Afectación de la comprensión de palabras aisladas 	<p>Dos de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Dificultad para evocar palabras aisladas en la conversación espontánea y en la denominación 2. Afectación de la repetición de frases largas
Criterios menores	<p>Y dos de los tres siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Afectación de la comprensión de frases sintácticamente complejas 2. Comprensión de palabras aisladas respetada 3. Reconocimiento de objetos respetado 	<p>Y tres de los cuatro siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Reconocimiento de objetos alterado, particularmente de aquellos poco familiares o empleados 2. Dislexia o digrafía de superficie 3. Repetición conservada 4. Ausencia de agramatismo y de apraxia del habla 	<p>Y tres de los cuatro siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Errores fonológicos en la conversación espontánea y en la denominación 2. Comprensión de palabras aisladas y reconocimiento de objetos respetados 3. Ausencia de agramatismo 4. Ausencia de apraxia del habla

Abreviaciones: APP-vnf: variante no fluente/agramatical de la afasia primaria progresiva; APP-vs: variante semántica de la afasia primaria progresiva; APP-vl: variante logopénica de la afasia primaria progresiva (Modificada de Gorno-Tempini et al., 2011).

La comprensión de estructuras morfosintácticas complejas, como oraciones subordinadas o pasivas, puede estar afectada en la APP-vnf. Esta tarea implica el control del sistema ejecutivo por lo que, consecuentemente, la comprensión gramatical en la APP-vnf se debe evaluar cautelosamente con tareas que minimicen el control ejecutivo para no malinterpretar los resultados (Grossman, 2012). Por el contrario, los déficits semánticos no son frecuentes en la APP-vnf e incluso en estadios avanzados, cuando los pacientes se encuentran mutistas, la comprensión se mantiene relativamente preservada (Harciarek y Kertesz, 2011).

Los criterios mayores para el diagnóstico de la APP-vs incluyen una alteración de la denominación por confrontación visual y la comprensión de palabras aisladas, especialmente de las menos familiares o habituales de una misma categoría semántica (Hodges et al., 1992). La anomia, secundaria a un defecto del almacén semántico, aunque está presente en otros subtipos de APP, es particularmente llamativa en la APP-vs (Mummery et al., 2000). De hecho, la pregunta “¿Qué es...?” fue una característica clínica diagnóstica de esta variante en un estudio reciente (Kertesz et al., 2010). El lenguaje espontáneo de la APP-vs puede resultar “excesivo” o desinhibido, con perseveraciones temáticas y frases estereotipadas. Para paliar sus defectos nominativos, los pacientes con APP-vs dan explicaciones genéricas e inexactas y cometen frecuentes parafasias semánticas, nombrando otras palabras de una categoría semántica cercana o más genérica (Hodges et al., 1992). Diversas publicaciones han descrito defectos aislados de categorías semánticas concretas en la APP-vs (Robinson et al., 2001; Zannino et al., 2006) así como una mayor afectación de la capacidad de denominar sustantivos frente a verbos (Bird et al., 2000). Por el contrario, los aspectos sintácticos, fonológicos y la repetición, se hallan intactos en la APP-vs.

Otra característica de la APP-vs es la dislexia de superficie o incapacidad para leer palabras con una correspondencia grafema-fonema que no sigue la norma de la lengua. Estos pacientes no leen basándose en el significado de las palabras sino basados en la fonología y por tanto, regularizan las palabras irregulares según las normas generales de conversión grafema-fonema (Wilson et al., 2009). Lo mismo puede ocurrir con la escritura, fenómeno conocido como disgrafía de superficie (Caine et al., 2009).

Por último, la APP-vl, según estos criterios, se caracteriza por la alteración de la repetición de frases largas y dificultad para la evocación de palabras, esta última, secundaria a un problema de acceso al almacén semántico (Gorno-Tempini et al., 2004). Consecuentemente, el lenguaje espontáneo de los pacientes logopénicos es entrecortado y presenta numerosas pausas de búsqueda. De hecho, esta aparente “hipofluencia” ocasionó que, previamente a la descripción de la APP-vl, muchos de los pacientes “logopénicos” fueran clasificados como APNF (Weintraub et al., 1990). Sin embargo, aunque el fenotipo del lenguaje espontáneo pueda similar a la APP-vnf, los pacientes logopénicos carecen de problemas articulatorios o gramaticales francos. Particularmente, los pacientes logopénicos no omiten morfemas derivativos, determinantes o conjunciones y por tanto su lenguaje no resulta tan telegráfico como el de la APP-vnf (Wilson et al., 2010).

Otro rasgo clínico de la APP-vl, son los errores (parafasias) fonológicos cometidos al denominar la palabra diana y seleccionar inadecuadamente los fonemas que posteriormente

serán articulados. Aunque la palabra diana no pueda ser evocada, las características léxico-semánticas que la definen están preservadas y, por tanto, los pacientes son capaces de reconocerla cuando se les ofrecen alternativas. Este fenómeno, conocido como “tip of the tongue” (“en la punta de la lengua”), pues los pacientes frecuentemente usan la expresión de “lo tengo en la punta de la lengua” para referirse a él, también se beneficia de pistas fonéticas y suele ser, igualmente, motivo de queja de los pacientes con EA (Delazer et al., 2003; Hillis, 2007).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por unificar las variantes de APP, existen casos con características aisladas o mixtas que no se ajustan a los criterios clínicos actuales y continúan siendo APP inclasificables (APP-i). Esto es especialmente así en los estadios muy iniciales mono-sintomáticos de APP o en los casos muy evolucionados, donde el solapamiento de diversos síntomas es habitual y el diagnóstico diferencial resulta muy complicado.

4. Epidemiología y evolución clínica de la afasia primaria progresiva y sus variantes

Ningún estudio poblacional que describa la frecuencia de la APP se ha publicado hasta la fecha. El doctor Grossman sugirió una estimación aproximada basada en que la mayoría de los casos de APP se engloban en el espectro de la DLFT. La prevalencia estimada de la DLFT es de 2,7-15/100.000 habitantes/año (Ratnavalli et al., 2002; Ikejima et al., 2009) y su incidencia anual es del 2,2-3,5/100.000 (Knopman et al., 2004; Mercy et al., 2008). La revisión de los datos neuropatológicos de pacientes diagnosticados en vida de los diversos síndromes clínicos asociados a la DLFT, reveló una APP en el 20-40% de los casos (Hodges et al., 2004; Kertesz et al., 2005; Johnson et al., 2005; Snowden et al., 2007a). Sin embargo, no todas estas series ofrecen datos acerca de las variantes de APP (Kertesz et al., 2005).

La mayoría de los casos de DLFT se presentan entre los 45 y los 65 años, con una edad de inicio media en torno a los 50 años (Cerami et al., 2012). En la misma línea, la APP se inicia entre los 50-60 años, aunque puede aparecer en un amplio rango de edad, desde los 30 hasta los 80 años (Johnson et al., 2005; Le Rhun et al., 2005). En la cohorte de Johnson y col la edad de inicio media de la APNF fue de 63 años ($\pm 9,7$) y la de la DS de 59 años ($\pm 8,2$) (Johnson et al., 2005). Sin embargo, otro estudio descriptivo con datos demográficos de 100 pacientes con APP-vs, reveló una edad de inicio media de esta variante más tardía (64.2 años ± 7.1) con un rango comprendido entre los 40-79 años (Hodges et al., 2010).

Datos similares se hallaron en el estudio comparativo de las tres variantes clínicas actuales de APP del grupo de la doctora Gorno-Tempini, donde la edad de inicio media de la APP-vs fue de 63 años (± 5.8), la de la APP-vnf de 67,9 años (± 8.1) y de la APP-vl de 72 años (± 8.5) (Gorno-Tempini et al., 2004). Un estudio posterior de esta misma autora, que incluía solamente casos de APP-vl, mostró una edad de inicio inferior en los pacientes logopénicos, siendo la media de 58,8 años (Gorno-Tempini et al., 2008).

En algunos pacientes el lenguaje puede ser el único dominio cognitivo afecto durante más de diez años, sin embargo lo habitual es que la APP progrese hacia un proceso más generalizado. Algunos autores han propuesto el término “APP+” para designar a los pacientes con APP que desarrollan evolutivamente otros déficits cognitivos, conductuales o motores (Mesulam, 2007). En líneas generales, según las trayectorias biológicas de progresión de la APP, los pacientes con APP-vs desarrollan síntomas conductuales y acaban cumpliendo criterios clínicos de la vcDFT (Rosen et al., 2006). La mayoría de los pacientes con APP-vnf evolucionan a un síndrome mixto cognitivo-motor con rasgos clínicos de parkinsonismo atípico, sugestivo de un síndrome córtico-basal (SCB), un síndrome de parálisis supranuclear progresiva (SPSP) o un fenotipo mixto SCB/SPSP (Kertesz et al., 2005; Josephs et al., 2006b; Sánchez-Valle et al., 2006; Murray et al., 2007; Rohrer et al., 2010a). De hecho, los actuales criterios diagnósticos de la DCB han incluido a la afasia como uno de los fenotipos clínicos de presentación inicial posibles (Armstrong et al., 2013). Hasta el 40% de los casos de DCB estudiados clínico-patológicamente en diversas cohortes se han presentado inicialmente como una afasia, principalmente como una APP-vnf y el 52% de los pacientes con una DCB desarrollaron este tipo de afectación del lenguaje conforme la enfermedad evolucionaba (Armstrong et al., 2013).

Inicialmente, mientras los déficits se circunscriben al área del lenguaje, los pacientes permanecen relativamente independientes para las ADL. Conforme la enfermedad evoluciona, más de la mitad de los pacientes pierden su independencia funcional en una media de 6-7 años, de forma más tardía que en otras demencias (Le Rhun et al., 2005). Diversos estudios neuropatológicos han evidenciado un mayor declinar cognitivo y funcional y una menor supervivencia en los pacientes con DLFT comparados con los pacientes con EA (Hodges et al., 2003; Roberson et al., 2005; Rascovsky et al., 2005). Por otra parte, los intentos de determinar el pronóstico en los casos DLFT-tau respecto a los DLFT-TDP43 han mostrado resultados discordantes. Lo que sí parece indiscutible es que la DLFT asociada a una esclerosis lateral amiotrófica (ELA) tiene una menor supervivencia, con una media aproximada de dos años desde la aparición de los signos de enfermedad de motoneurona (Josephs et al., 2005; Xie et al., 2008). Sin embargo, la velocidad de

progresión de la enfermedad así como el patrón de declinar varía en cada caso individual de APP (Kertesz et al., 2005). En un estudio demográfico de una cohorte francesa de 49 pacientes con APP, la supervivencia media se situó en torno a los 7 años. La media de edad de defunción fue de 71 años y la principal causa de ésta fue una neumonía aspirativa (Le Rhun et al., 2005). En la APP-sv se ha sugerido un curso más benigno, siendo la supervivencia media de los pacientes de 12.8 años (Hodges et al., 2010). Solo un estudio ha sugerido que en el declinar de la APP el sexo pueda ejercer una influencia, objetivándose una progresión más rápida en las mujeres que en los hombres (Rogalski et al., 2007).

Aunque en algunas series se ha visto una mayor proporción de mujeres afectas con la APP-vl (Gorno-Tempini et al., 2008) los estudios disponibles hasta la fecha no han mostrado una mayor prevalencia de la APP en términos de sexo (Grossman et al., 2010). Tampoco se ha encontrado ningún factor ambiental que se asocie a un mayor riesgo de desarrollar una APP (Rosso et al., 2003).

5. Correlación clínico-patológica de las variantes clínicas de la afasia primaria progresiva

Cada variante clínica de APP puede estar causada por diferentes entidades neuropatológicas, por lo que los estudios de correlaciones clínico-patológicas son de gran interés para definir fenotipos clínicos que identifiquen en vida el sustrato molecular subyacente. Sin embargo, la mayoría de los estudios disponibles hasta la fecha, datan de antes de la clasificación de consenso de APP y están centrados en la APNF y la DS. Además, los criterios diagnósticos de otros subtipos clínicos de APP incluidos no fueron iguales, mostrando en ocasiones resultados discordantes (Kertesz et al., 2005; Knibb et al., 2006; Josephs et al., 2006a; Snowden et al., 2007a; Mesulam et al., 2008; Deramecourt et al., 2010). A pesar de esta heterogeneidad, el sustrato neuropatológico/molecular de la APP abarca el abanico de la DLFT y la EA. También algunas series describieron pacientes con DSHHD, según la clasificación neuropatológica vigente en su momento, aunque estos casos son prácticamente inexistentes desde el desarrollo de las nuevas técnicas inmunohistoquímicas (Mackenzie et al., 2006; Cairns et al., 2007; Mackenzie et al., 2010).

Los principales subtipos neuropatológicos de la DLFT subyacentes en la APP son: DLFT con acúmulo de la proteína tau (DLFT-tau o taupatías) y DLFT con inclusiones

neuronales inmunorreactivas para la proteína TAR-DNA binding protein 43 (DLFT-TDP43 o proteinopatías TDP43).

- **DLFT-tau:** La proteína tau, codificada por el gen *MAPT* (*Microtubule Associated Protein Tau*), es una fosfoproteína implicada en el mantenimiento de la estabilidad neuronal y el transporte axonal (Rademakers et al., 2004). Existen 2 subgrupos de isoformas de tau, en función de la presencia o no del exón 10 durante el procesamiento del ARN mensajero. La inclusión del exón 10 produce isoformas de 4 repeticiones (4R) en el dominio de unión a microtúbulos. Estas isoformas predominan en los depósitos de proteína tau de la DCB, la PSP o la enfermedad por gránulos argirófilos, entidades que se conocen también como taupatías 4R. Por el contrario, la exclusión del exón 10 proporciona isoformas de 3 repeticiones (3R), las cuales predominan en la DLFT con cuerpos de Pick (Dickson et al., 2011).
- **DLFT-TDP43:** Algunos casos de DLFT con histopatología negativa para tau, mostraban inmunorreactividad positiva para ubiquitina (DLFT-U). Posteriormente se demostró que la proteína TDP43 era el componente mayoritario de las inclusiones de ubiquitina (Neumann et al., 2006). En la actualidad se distinguen cuatro subtipos histológicos dentro de las proteinopatías TDP43 (Mackenzie et al., 2011). Cada uno de ellos se asocia con unos hallazgos neuropatológicos, alteraciones genéticas y un fenotipo clínico específicos.

Siete de los principales estudios de correlación clínico-patológica de APP, que incluyen 145 casos en total, fueron revisados por el doctor Grossman, quien estimó que la asociación de cada variante clínica de APP con una neuropatología concreta era del 50-70% de los casos (Grossman, 2010). A continuación se resumen los principales hallazgos neuropatológicos en cada una de las tres variantes de APP.

- **APP-vnf:** La neuropatología de la APP-vnf es la más heterogénea, siendo el sustrato más frecuente (52%) una DLFT-tau, mayoritariamente taupatías 4R (DCB o PSP). Josephs y col mostraron que los pacientes con una apraxia del habla aislada se asocian frecuentemente con neuropatología de una PSP, mientras que los pacientes con fenotipo mixto apraxia del habla/APNF muestran neuropatología de una DCB. Este grupo también encontró asociaciones entre la APNF con la DLFT-U (Josephs et al., 2006a). Otros casos de APP-vnf con una DLFT con cuerpos de Pick también han sido publicados (Yokota et al., 2009) e incluso hay un caso descrito con hallazgos patológicos de una demencia por cuerpos de Lewy (DCL) (Kertesz et al., 2005).

Aunque la asociación de la APP-vnf con la EA era bien conocida (Greene et al., 1996), solamente los estudios más recientes han evidenciado que hasta el 30-40% de los casos de APP-vnf se corresponden con una neuropatología de EA (Kertesz et al., 2005; Knibb et al., 2006; Alladi et al., 2007). Sin embargo, muchas de estas series incluyeron a pacientes diagnosticados de APP-vnf antes de que la variante logopénica fuera descrita en el 2004 y su interpretación debe ser cautelosa. En la serie de Alladi, por ejemplo, tres de los cinco pacientes clasificados como “afasia mixta” hoy cumplirían criterios de APP-vl (Alladi et al., 2007)

Otra entidad neuropatológica subyacente a la APP-vnf es la DLFT-TDP43. En el trabajo de Deramecourt y col los seis pacientes con APP-vnf y agramatismo aislado se correspondían con este sustrato patológico (Deramecourt et al., 2010). En cuatro de ellos se confirmó una mutación en *GRN*. Otros casos de APP-vnf asociados a mutaciones en *GRN* también han mostrado inclusiones neuronales de TDP43 tipo A (Knibb et al., 2006; Snowden et al., 2007a). Además, la APP-vnf asociada a la expansión del hexanucleótido CCCCCG en el *C9ORF72*, también se corresponde con una DLFT-TDP43 (Snowden et al., 2012; Mahoney et al., 2012).

- **APP-sv:** La mayoría de los casos de APP-vs (69%) se corresponden con una DLFT-TDP43 (Kertesz et al., 2005; Snowden et al., 2007a). Al contrario que las inclusiones TDP43 de la APP-vnf, los hallazgos patológicos en la APP-vs se corresponden con una DLFT-TDP43 tipo C (Mackenzie et al., 2011).

La APP-vs también se ha asociado, aunque en casos aislados, con una DLFT con cuerpos de Pick (Hodges et al., 2004; Davies et al., 2005) y hasta en un 25% con neuropatología de EA (Knibb et al., 2006; Alladi et al., 2007).

- **APP-vl:** Cuando la doctora Gorno-Tempini describió la variante logopénica, ésta mostró una atrofia selectiva de la encrucijada temporo-parietal. La autora sugirió que, puesto que esta región anatómica se había asociado en estudios de neuroimagen y neuropatológicos previos con una EA con predominio del lenguaje, éste debía ser también el sustrato neuropatológico más probable de la APP-vl. La evidencia de una mayor proporción del alelo APOE $\epsilon 4$ en los pacientes logopénicos también sugería su asociación con la EA. En varias series patológicas publicadas en 2008 se corroboró esta hipótesis y se vio que la mayoría de los casos diagnosticados en vida de APP-vl se correspondían con una histopatología de EA (Mesulam et al., 2008; Josephs et al., 2008). En la serie de Josephs y col esta asociación fue del 100% (5/5) mientras que en la de Mesulam fue del 64% (7/11). El 36% restante de los pacientes con APP-

v1 de la cohorte de este último autor se correspondían con casos de DLFT-tau y de DLFT-U. El grupo del doctor Grossman, también encontró casos con DLFT-TDP43 en pacientes con APP-v1 (Grossman et al., 2008).

6. Biomarcadores diagnósticos

En los últimos años, para mejorar las correlaciones clínico-patológicas, se han introducido en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas biomarcadores de neuroimagen, genéticos y bioquímicos, todos ellos validados en estudios patológicos. Estos tres tipos de biomarcadores se han incorporado en grados diferentes al estudio de la APP y actualmente presentan un rol crucial en su diagnóstico etiológico.

6.1. Biomarcadores de neuroimagen

Múltiples estudios de neuroimagen estructural (RM) y funcional (SPECT/PET) han identificado las regiones anatómicas afectas en la APP y han mostrado que la atrofia y/o hipoperfusión/hipometabolismo en la APP es asimétrica, con una mayor afectación de regiones temporales y perisilvianas del hemisferio izquierdo (Gorno-Tempini et al., 2004; Nestor et al., 2007; Rabinovici et al., 2008; Rohrer et al., 2009; Sapolsky et al., 2010; Rogalsky et al., 2011). Además, estos estudios han evidenciado la asociación de cada una de las variantes clínicas de APP con pérdida de sustancia gris en localizaciones anatómicas concretas (figura 1).

Estos estudios se han concretado en criterios de neuroimagen estructural y/o funcional de apoyo al diagnóstico clínico de cada una de las variantes clínicas de APP (tabla 2) (Gorno-Tempini et al., 2011).

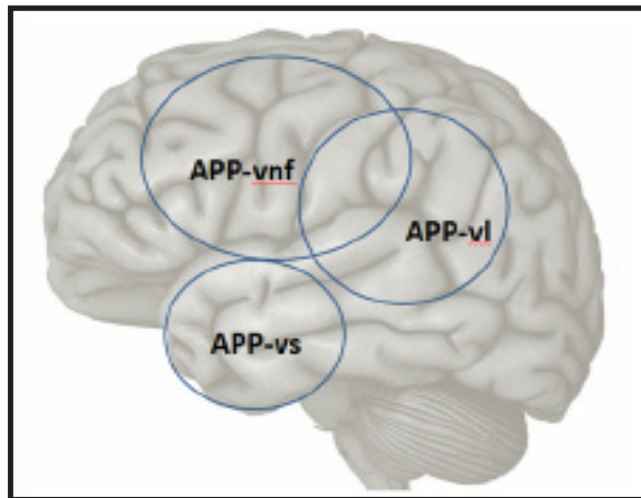


Figura 1. Dibujo esquemático de las regiones anatómicas afectadas en las tres variantes de APP (Modificada de Harciarek y Kertesz, 2011).

Abreviaciones: APP-vnf: variante no fluente/agramatical de la afasia primaria progresiva; APP-vs: variante semántica de la afasia primaria progresiva; APP-vl: variante logopélica de la afasia primaria progresiva.

Tabla 2. Actuales criterios diagnósticos de apoyo de la neuroimagen de la APP.

	APP-vnf	APP-vs	APP-vl
CRITERIOS	<p>Ambos presentes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico clínico de APP-vnf 2. Uno o más de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - Atrofia predominante en la región frontal posterior-insular izquierda en la RM o - Hipo-perfusión o hipo-metabolismo predominante en la región frontal posterior-insular izquierda en el SPECT o PET 	<p>Ambos presentes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico clínico de APP-vs 2. Uno o más de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - Atrofia predominante en la región temporal anterior en la RM o - Hipo-perfusión o hipo-metabolismo predominante en la región temporal anterior en el SPECT o PET 	<p>Ambos presentes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diagnóstico clínico de APP-vl 2. Uno o más de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - Atrofia predominante en la región perisilviana posterior-parietal izquierda en la RM o - Hipo-perfusión o hipo-metabolismo predominante en la región perisilviana posterior-parietal izquierda en el SPECT o PET

Abreviaciones: APP-vnf: variante no fluente/agramatical de la afasia primaria progresiva; APP-vs: variante semántica de la afasia primaria progresiva; APP-vl: variante logopélica de la afasia primaria progresiva (Modificada de Gorno-Tempini et al., 2011).

Conforme la enfermedad evoluciona el patrón de atrofia focal que caracteriza inicialmente a cada variante de APP se generaliza, dificultando el diagnóstico radiológico (Rohrer et al., 2009). Hasta la fecha sólo un estudio ha evaluado prospectivamente la evolución de la atrofia cortical en las tres variantes de la APP (Rogalski et al., 2011). En esta cohorte, tras dos años de seguimiento clínico, el adelgazamiento cortical se extendió en ambos hemisferios a las regiones colindantes de la zona afecta inicialmente. Sin embargo, la atrofia siguió siendo más prominente en el hemisferio izquierdo.

Los estudios con PET de amiloide con el compuesto B de Pittsburgh (PIB) marcado con carbono 11 (PIB-¹¹C), un trazador que se une selectivamente al β-amiloide fibrilar, han mostrado su valiosa utilidad en el diagnóstico *in vivo* de amiloidosis cortical en sujetos con EA (Klunk et al., 2004; Herholz et al., 2011). Esta técnica provee información cuantitativa sobre los depósitos del β-amiloide en pacientes diagnosticados clínicamente de EA y de DFT y permite discriminar ambas patologías (Rabinovici et al., 2007). Su aplicación en el estudio de la APP ayuda a diferenciar los pacientes con un sustrato neuropatológico sugestivo de EA respecto a aquellos con sustratos no relacionados con amiloidosis, como las taupatías o proteinopatías TDP43. Actualmente hay publicadas dos cohortes de pacientes con APP estudiadas con PET-PIB-¹¹C (Rabinovici et al., 2008; Leyton et al., 2012). El estudio de Rabinovici y col evidenció la positividad del PET de amiloide en los cuatro pacientes con APP-vl incluidos, mientras que el estudio de Leyton y col lo hizo en 12 de los 13 pacientes logopénicos. En ellos, el patrón de captación del trazador fue similar al evidenciado en los casos de EA (Klunk et al., 2004; Herholz et al., 2011). Por el contrario, entre un 11-20% de los pacientes con APP-vs y un 16-25% de los pacientes con APP-vnf mostraron un PET-PIB-¹¹C positivo. Los resultados de estos estudios sugieren que la presencia de amiloidosis indicativa de neuropatología de EA es menos común en la APP-vnf y la APP-vs. Sin embargo, todavía resulta incierto en qué proporción un PET-PIB-¹¹C positivo en las distintas variantes de APP indica si la enfermedad está causada únicamente por neuropatología de EA, si la EA es copatología asociada a una DLFT o si el hallazgo de amiloidosis es incidental. Recientemente se ha publicado el único caso con confirmación neuropatológica descrito hasta la fecha, de una paciente con APP-vnf que presentó, al final de su enfermedad, un deterioro cognitivo generalizado y un PET-PIB-¹¹C positivo (Caso et al., 2013). El estudio post-mortem reveló una enfermedad de Pick y copatología de EA, evidenciando que la positividad de los biomarcadores *in vivo* de amiloide no debe considerarse concluyente de que el sustrato patológico de un síndrome clínico típicamente ligado a la DLFT es exclusivamente secundario a una EA. Así pues, dado que actualmente, se carece de confirmación neuropatológica de los sujetos con APP evaluados con PET-PIB-¹¹C, la positividad de estos estudios debe interpretarse con cautela.

Por otra parte, solamente un estudio ha evaluado *in vivo* mediante PET-PIB-¹¹C a pacientes con una apraxia del habla aislada, entidad asociada a la DLFT-tau. En él ningún caso mostró evidencia de amiloidosis cortical (Josephs et al., 2012). A pesar de los prometedores resultados, los criterios diagnósticos actuales de la APP no incluyen específicamente los estudios de PET-PIB-¹¹C. Por otra parte, éstos se realizan en un contexto de investigación y no están aprobados para su uso a nivel clínico.

Hay otras técnicas de neuroimagen que se han mostrado útiles en otras enfermedades neurodegenerativas y que, sin embargo, no han sido evaluadas en la APP. Entre ellas se encuentra el SPECT con ¹²³I-2β-carbometoxi-3β-(4-iodofenil)-N-(3-fluoropropil)-nortropano (¹²³I-FP-CIT). Este radiotrazador se une al transportador activo de la dopamina (DAT) de la membrana pre-sináptica. Por tanto, el SPECT con ¹²³I-FP-CIT, permite valorar la cantidad de DAT a nivel estriatal, convirtiéndose en un útil biomarcador de la integridad del sistema nigroestriatal. Así, esta técnica detecta la degeneración dopaminérgica nigroestriatal asociada a diferentes tipos parkinsonismos como la enfermedad de Parkinson (Benamer et al., 2000), la DCL (McKeith et al., 2007), la atrofia multisistémica (Pirker et al., 2002), la DCB (Klaffke et al., 2006) o la PSP (Filippi et al., 2006). El SPECT con ¹²³I-FP-CIT detecta igualmente alteraciones nigroestriatales en pacientes asintomáticos a riesgo de desarrollar parkinsonismo, como son los pacientes con trastorno de conducta del sueño REM (Iranzo et al., 2011) o los portadores asintomáticos de mutaciones en los genes *PARK 2* y *PARK 6* (Pellecchia et al. 2007). Estos datos manifiestan que la reducción de la captación estriatal de ¹²³I-FP-CIT puede considerarse un marcador subclínico de degeneración nigroestriatal. En este contexto, esta técnica podría ser igualmente útil en el estudio de la vía nigroestriatal en la APP.

6.2. Biomarcadores genéticos

A pesar de que hasta el 40% de los pacientes con DLFT tienen una historia familiar de demencia, en al menos un familiar de primer o segundo grado, hay poca evidencia de que la APP se herede y la mayoría de los casos son esporádicos (Grossman, 2010). Por su parte, de los casos de DLFT con historia familiar, solo un 10% se heredan de forma autosómica dominante (Goldman et al., 2011). La mayoría de estas familias presentan mutaciones en uno de los tres genes más importantes de la DLFT: *MAPT* (entre un 9-21%), *GRN* (entre un 4-23%) y *C9ORF72* (entre un 12-18%). Otros genes relacionados con la DFT son *TARDBP*, *FUS* (ambos asociados con la DFT-ELA familiar), *CHMP2B* (más frecuentemente asociado a ELA y raramente a DFT) y *VCP* (relacionado con el fenotipo clínico de DFT con miopatía con cuerpos de inclusión y enfermedad de Paget asociados) (Cerami et al., 2012; Cohn-Hokke et al., 2012).

Los casos de APP genéticamente determinados se heredan de forma autosómica dominante. La mayoría de estos pacientes presentan mutaciones en el gen *GRN* (Snowden et al., 2006; Mesulam et al., 2007). En estos casos, el fenotipo clínico de la APP, se corresponde frecuentemente con una APP-vnf. Sin embargo, la APP-vnf se ha asociado también a mutaciones en *MAPT*, *TARDBP* y *C9ORF72* (van Swieten et al., 2007; Grossman, 2012; Snowden et al., 2012; Mahoney et al., 2012).

Existen guías clínicas para orientar el consejo genético en casos de DFT con historia familiar (Cohn-Hokke et al., 2012; Goldman, 2012; Le Ber et al., 2013). Las recomendaciones actuales aconsejan realizar el cribado genético en los casos con historia familiar de DFT de herencia autosómica dominante y en aquellos con historia familiar de demencia de inicio precoz. Según la edad de presentación, el fenotipo clínico o hallazgos de la neuroimagen, se prioriza el estudio genético de uno u otro de los genes implicados en la DLFT. En caso de no detectar mutaciones en ninguno de estos genes, se recomienda ampliar el estudio a otros genes como el gen presenilina 1 (*PSEN1*) o el de la proteína priónica (*PRNP*), pues mutaciones en estos genes pueden presentarse con un fenotipo “DFT-like”.

En ausencia de una historia familiar de demencia, la detección de mutaciones en *MAPT* se hace altamente improbable debido a su elevada penetrancia a los 60 años (>95%). Por el contrario, la penetrancia de *GRN* o de la expansión hexanucleotídica en *C9ORF72* a los 60 años es mucho menor (50%), por lo que se ha sugerido un cribado mutacional en todos los pacientes con DFT, independientemente de la edad de inicio o de la historia familiar de demencia (Cohn-Hokke et al., 2012). La mayoría de las mutaciones patogénicas de *GRN* se producen a través de una haploinsuficiencia, generando un alelo funcionalmente nulo (Yu et al., 2010). De esta manera, la detección de niveles séricos o plasmáticos bajos de progranulina se ha propuesto como un excelente biomarcador de cribado -con buena sensibilidad y especificidad y bajo coste económico- para detectar portadores de mutaciones en *GRN* (Finch et al., 2009; Schofield et al., 2010). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de esta técnica varía según los puntos de corte establecidos, y entre los diferentes estudios, y no ha sido valorada en nuestro país.

La presencia del alelo APOE $\epsilon 4$ se considera un factor de riesgo para desarrollar una EA. Los pacientes portadores de un APOE $\epsilon 4$ presentan un inicio de la enfermedad más precoz y un menor rendimiento en tareas de memoria episódica (Slooter et al., 1998; Marra et al., 2004). Respecto a la asociación del APOE $\epsilon 4$ con la DLFT, diversos estudios han mostrado resultados contradictorios (Geschwind et al., 1998; Bernardi et al., 2006). La heterogeneidad de estos datos, puede deberse, en parte, a que algunos pacientes se pudieron

haber clasificado clínicamente de forma errónea, ya que hasta un 20% de los casos con diagnóstico clínico de DFT presentan en la autopsia patología de EA (Forman et al., 2006). Un estudio describió una mayor frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en pacientes con APP-vs respecto a pacientes con APP-vnf y DFT (Short et al., 2002). Por el contrario, en el estudio de la doctora Gorno-Tempini, ningún caso de APP-vs mostró positividad del APOE $\epsilon 4$, siendo la frecuencia de este alelo del 20% en la APP-vnf y del 67% en la APP-vl (Gorno-Tempini et al., 2004).

Los nuevos criterios diagnósticos de APP incluyen la presencia de mutaciones en los genes causantes de DLFT como biomarcadores de patología definitiva, es decir, con la misma validez etiológica que una histopatología específica. Sin embargo, los propios autores del consenso internacional, admiten que la clasificación se ha propuesto para casos esporádicos y no siempre es posible su aplicación en los casos genéticos. Se necesita, por tanto, estudiar con más detalle los fenotipos clínicos de los casos genéticos de APP para ver si se pueden englobar bajo el fenotipo clínico de las tres variantes definidas hasta la fecha o presentan un fenotipo mixto o inclasificables de APP según los nuevos criterios (Gorno-Tempini et al., 2011).

6.3. Biomarcadores bioquímicos

En la EA, los biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR) ($A\beta_{42}$, como marcador de amiloidosis y tau total (t-tau) y tau fosforilada ($p\text{-tau}_{181}$), como marcadores de neurodegeneración) son excelentes indicadores de los cambios neuropatológicos que subyacen a esta enfermedad (Blennow et al., 2003; Schoonenboom et al., 2004; Shaw et al., 2009; Blennow et al., 2010). Niveles reducidos de $A\beta_{42}$ presentan una buena correlación con el diagnóstico clínico de EA y con la patología amiloidogénica extracelular en los estudios post-mortem (Strozyk et al., 2003). Igualmente, niveles elevados de la proteína tau en el LCR correlacionan con la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares en las autopsias (Tapiola et al., 1997). Un dato interesante es que, por el contrario, no se han evidenciado niveles elevados de tau en pacientes con taupatías como la PSP o la DCB, que presentan un mayor acúmulo de esta proteína en los estudios necrópsicos respecto a la EA (Grossman et al., 2005; Bian et al., 2008). Se han sugerido algunas hipótesis ante este hallazgo, como que el amiloide extracelular puede interferir en el aclaramiento de la proteína tau en la EA, que pueden haber diversos subtipos patológicos de la misma proteína involucrados en la EA y en la PSP/DCB o que otros factores, todavía desconocidos, influyen en una menor degradación de la proteína tau en la EA versus la PSP/DCB (Ballatore et al., 2007).

En contraste con la amplia literatura existente sobre el perfil de $A\beta_{42}$ y proteína tau en la EA y su utilidad como biomarcadores precoces en el diagnóstico de esta patología, la bibliografía sobre biomarcadores en LCR en la DFT es más escasa. Los resultados de los primeros estudios comparativos del $A\beta_{42}$ y tau en la DFT frente a la EA arrojaron resultados discordantes respecto a los niveles de los mismos (Sjögren et al., 2000; Riemenschneider et al., 2002; Grossman et al., 2005; Paraskevas et al., 2005). Estas discrepancias observadas inicialmente se pueden atribuir, en parte, a que los diagnósticos clínicos de DFT y EA no siempre se corresponden con los diagnósticos neuropatológicos. Estudios posteriores, éstos ya basados en cohortes con confirmación patológica, sugieren que ambas entidades presentan un perfil distinto de biomarcadores y coinciden en que los tres biomarcadores ($A\beta_{42}$, t-tau y p-tau₁₈₁) deben usarse en combinación para alcanzar una mayor discriminación diagnóstica entre la DFT y la EA. En el estudio de Bian y col, la ratio t-tau/ $A\beta_{42}$ fue significativamente menor en el grupo de DLFT que en el de EA. Además, el análisis de las curvas ROC mostró que una ratio de 1.06 presentaba una buena sensibilidad y especificidad para distinguir ambas patologías (Bian et al., 2008). El estudio de Kapaki y col (Kapaki et al., 2008), que presentaba el mismo diseño, hizo hincapié en que la proteína p-tau₁₈₁ presentaba mayor especificidad en el diagnóstico de la EA y que la ratio p-tau₁₈₁/ $A\beta_{42}$ mostraba una mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico diferencial de la EA y la DLFT.

En los últimos años, diferentes estudios de investigación han mostrado la asociación entre la positividad de ambos biomarcadores en LCR con la APP-vl (Rohrer et al., 2010d; Rohrer et al., 2012). Sin embargo, los marcadores bioquímicos no están incorporados actualmente a los criterios diagnósticos de las tres variantes de APP. En este sentido, el perfil de biomarcadores de EA en LCR, no ha sido estudiado previamente en ninguna cohorte de APP que incluya a sujetos con las tres variantes de APP y a sujetos con APP-i.

En este contexto, el objetivo global de la presente tesis doctoral es profundizar en la caracterización clínica de la APP y sus variantes y en el conocimiento de biomarcadores que permitan realizar una aproximación en vida al sustrato neuropatológico más probable en cada caso de APP con el fin último de ofrecer a cada paciente el tratamiento y pronóstico más adecuado posible.

III. Hipótesis

1. Los sujetos con afasia primaria progresiva se podrán clasificar en tres variantes clínicas utilizando elementos claves de la evaluación de las características del habla y del lenguaje. Los criterios diagnósticos de apoyo de neuroimagen, tanto estructural como funcional, serán de diferente utilidad en cada una de las variantes clínicas. Los marcadores bioquímicos y genéticos serán útiles para orientar el diagnóstico etiológico de pacientes con afasia primaria progresiva.

2. Pacientes con diferentes síndromes cognitivos, entre ellos pacientes con afasia primaria progresiva, podrán presentar diferencias en los niveles séricos medios de progranulina. La determinación sérica de los niveles de progranulina podrá ser un biomarcador sensible para detectar portadores de mutaciones en el gen *GRN*. Las mutaciones patogénicas en el gen *GRN* se podrán presentar con distintos fenotipos clínicos, entre ellos, afasia primaria progresiva.

3. Los pacientes con la variante no fluente/agramatical de la afasia primaria progresiva, aún sin evidencia clínica de parkinsonismo, podrán presentar alteraciones en la vía nigroestriatal objetivables mediante ^{123}I -FP-CIT SPECT, algo que no ocurrirá en los pacientes con la variante logopéica de la afasia primaria progresiva.

IV. Objetivos

1. Analizar las características de la alteración del lenguaje en una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de afasia primaria progresiva y clasificarlos seleccionando elementos clínicos claves. Investigar, a nivel individual y grupal, la asociación entre los criterios diagnósticos clínicos y de neuroimagen (RM y/o SPECT/PET) vigentes en cada variante clínica de afasia primaria progresiva. Analizar los diversos marcadores bioquímicos y genéticos en cada variante clínica de afasia primaria progresiva y valorar su utilidad como marcadores diagnósticos.

2. Cuantificar los niveles séricos de progranulina en una cohorte de pacientes con diferentes síndromes cognitivos, entre ellos pacientes con afasia primaria progresiva. Valorar la utilidad de los niveles séricos de progranulina como biomarcador para detectar portadores de mutaciones patogénicas en el gen *GRN*. Describir el fenotipo clínico con el que se presentan los pacientes portadores de mutaciones en el gen *GRN*.

3. Estudiar la integridad de la vía nigroestriatal mediante ^{123}I -FP-CIT SPECT en una muestra de pacientes con la variante no fluente/agramatical y logopénica de la afasia primaria progresiva sin parkinsonismo clínico.

V. Material y métodos

La metodología empleada en la presente tesis doctoral se explica con detalle en los apartados correspondientes de material y métodos de los tres trabajos de investigación diseñados. En este apartado, únicamente se resumen los criterios de inclusión de los pacientes estudiados y las principales técnicas diagnósticas empleadas. Al final del mismo se incluye un breve comentario de los aspectos éticos relacionados con la investigación clínica.

Diseño

Los tres trabajos que constituyen la presente tesis doctoral son transversales. Los trabajos 1 y 3 son de reclutamiento prospectivo y el trabajo 2 es un estudio retrospectivo. Todos ellos se llevaron a cabo en la Unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos del Servicio de neurología del Hospital Clínic de Barcelona.

Sujetos

Los trabajos se han basado en dos cohortes distintas de pacientes:

1. Para valorar la utilidad de la determinación de los niveles séricos de progranulina para detectar mutaciones patogénicas en el gen *GRN*, se seleccionaron pacientes con diagnóstico clínico de: DFT, APP, EA, EA asociada a mutaciones en el gen *PSEN1*, portadores asintomáticos de mutaciones en *PSEN1* y controles.

2. Para estudiar a) la correlación entre los criterios diagnósticos clínicos y de neuroimagen vigentes en cada variante de APP, b) la utilidad de los biomarcadores de EA en LCR y los biomarcadores genéticos en el diagnóstico de cada variante de APP y c) el estado de la vía nigroestral mediante ^{123}I -FP-CIT SPECT en sujetos con APP-vnf y APP-vl sin parkinsonismo clínico, se seleccionaron pacientes con un diagnóstico clínico de APP según los criterios clínicos vigentes en la actualidad (Gorno-Tempini et al., 2011).

Además, los sujetos con APP-vnf y APP-vl seleccionados para el estudio con ^{123}I -FP-CIT SPECT, tras la cuantificación de los biomarcadores indicativos de EA en LCR y de los niveles séricos medios de progranulina, fueron nuevamente clasificados en dos subgrupos distintos:

a) APP-vnf/bio-, que englobó a aquellos sujetos con APP-vnf cuyo perfil de biomarcadores en LCR no se correspondía a una EA y que presentaban niveles séricos medios de progranulina normales.

b) APP-vl/EA, que correspondió a aquellos sujetos con APP-vl cuyo perfil de biomarcadores en LCR era compatible con una EA y cuyos niveles séricos medios de progranulina fueron normales.

Recogida de los datos clínicos

En los tres trabajos se realizó mediante la revisión de las historias clínicas de cada paciente.

A todos los sujetos participantes en los estudios de APP se les administró un completo formulario donde se recogía información relativa a:

1. Anamnesis centrada en antecedentes médicos relevantes, presencia de síntomas cognitivos, conductuales y motores y existencia de una historia familiar de APP, demencia, parkinsonismo o ELA.

2. Signos neurológicos presentes en una exploración neurológica completa, que incluía la subescala motora de la escala unificada para la evaluación de la enfermedad de Parkinson (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS).

3. Historia del trastorno del lenguaje, haciendo hincapié en las habilidades lingüísticas previas del paciente, la forma de inicio y evolución del problema del lenguaje, las circunstancias en las que se producían o agravaban los síntomas y la afectación de la comprensión y lecto-escritura concomitante.

4. Preguntas dirigidas a un familiar cercano, intentando recabar información sobre posibles dificultades en la generación, sentido, estructura y programación motora del mensaje que el paciente quería transmitir.

5. Análisis semi-cuantitativo de las características del lenguaje y del habla de los pacientes, realizado a través de la PALS adaptada a pacientes castellanoparlantes. Esta escala incluye un análisis del lenguaje espontáneo y la descripción de una lámina, la denominación por confrontación visual de 10 animales y de 10 herramientas, repetición y comprensión de palabras aisladas, repetición de frases y comprensión de órdenes seriadas. Cada ítem se puntúa en: 0= Ausente, 1=Sutil/cuestionable, 2= Ligero pero evidente y 3=Moderado-severo.

Intervenciones

Exploración neuropsicológica:

En la cohorte de APP se administró una completa evaluación cognitiva que valoró la memoria episódica, el lenguaje, las habilidades visuo-espaciales/perceptivas, praxias y funciones ejecutivas. La evaluación del lenguaje incluyó varios subtests de la batería de Boston para el diagnóstico de la afasia (Boston Diagnosis Aphasia Examination battery, BDAE) (Goodglass y Kaplan 1996), el test de denominación de Boston (Boston Naming Test, BNT) (Kaplan et al., 2001), fluencias fonéticas (Borkowsk et al., 1967) y el test de Pirámides y Palmeras (Howard y Patterson, 1992). En la evaluación de todos los tests neuropsicológicos se aplicaron las puntuaciones normativas existentes.

Estudio de biomarcadores séricos y en LCR

- Genotipo del gen APOE: Se determinó mediante amplificación del material genético a través de PCR y digestión enzimática posterior según el protocolo estándar.
- Niveles séricos de progranulina: Un kit comercial de ELISA se utilizó para determinar los niveles séricos de progranulina por duplicado en cada paciente (Adipogen®, Seoul, Korea). En todos los sujetos con niveles inferiores a 120 ng/mL se realizó secuenciación directa para investigar la presencia de mutaciones en el gen *GRN*.
- Estudio genético de mutaciones en los genes causantes de DFT: El estudio de *MAPT* y *GRN* se realizó a través de secuenciación directa seguida de identificación de los cambios patológicos de nucleótidos. El estudio de la expansión del hexanucleótido GGGGCC en el *C9ORF72* se realizó inicialmente mediante PCR con repetición de primers y el análisis posterior se llevó a cabo con el analizador genético ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y el software GeneMapper (versión 4.0, ABI).
- A β ₄₂, t-tau y p-tau₁₈₁ en LCR: Para la cuantificación de estos biomarcadores se utilizó la técnica de ELISA con kits comerciales de la compañía Innogenetics® (Ghent, Bélgica) siguiendo el protocolo del fabricante.

Pruebas de neuroimagen

- RM cerebral: Todas las imágenes se adquirieron en un único aparato de RM 3.0 Tesla Siemens Magnetom Trio (Erlangen, Germany) de la plataforma de imagen médica del Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS).
- Tc-HMPAO-SPECT/FDG-PET cerebral: Mediante estas dos técnicas se estudiaron el flujo sanguíneo, utilizando como marcador ^{99m}Tc -HMPAO (Ceretek, General Electric Healthcare) en una gamma-cámara (Infinia Hawkeye 4, General Electric Healthcare), y el consumo de glucosa cerebral, utilizando 18F-fluorodeoxiglucosa (FDG) como trazador en un PET-CT scanner (Biograph, Siemens), respectivamente.
- ^{123}I -FP-CIT SPECT: El estudio de la vía nigroestriatal mediante ^{123}I -FP-CIT SPECT o DaTSCAN® (GE Healthcare, Eindhoven, Netherlands) se realizó en el momento de la inclusión únicamente a los sujetos con APP-vnf y APP-vl. Además, se incluyeron para las comparaciones posteriores, los datos del ^{123}I -FP-CIT SPECT de un grupo de 20 controles, ajustados por edad. La adquisición de las imágenes del ^{123}I -FP-CIT SPECT y la cuantificación de las mismas se realizaron siguiendo el mismo protocolo publicado previamente (Iranzo et al., 2011).

Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el paquete estadístico PASW 18.0 (IBM corp.). En cada estudio se detallan los métodos estadísticos utilizados en cada comparación.

Aspectos éticos

Los diferentes trabajos de investigación que componen esta tesis doctoral han recibido la aprobación del Comité ético de investigación clínica (CEIC) del Hospital Clínic en las reuniones del día 17/04/2008 (Número de registro 2008/4207) y del día 07/04/2011 (Número de registro 2011/6595). Todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidos en los estudios. El estudio genético de los pacientes se realizó dentro del marco del programa PICOGEN (Programa de información y consejo genético para demencias familiares) que ha sido aprobado por el comité ético asistencial del Hospital Clínic de Barcelona.

VI. Resultados

Trabajo número 1

Neuroimaging and biochemical markers in the three variants of primary progressive aphasia.

Gil-Navarro S, Lladó A, Rami L, Castellví M, Bosch B, Bargalló N, Lomeña F, Reñé R, Montagut N, Antonell A, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R.

Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2013;35:106-117

IF 2.789 (JCR 2012); Q2 Clinical Neurology

Original Research Article

Neuroimaging and Biochemical Markers in the Three Variants of Primary Progressive Aphasia

S. Gil-Navarro^a A. Lladó^{a, d} L. Rami^a M. Castellví^a B. Bosch^a
N. Bargalló^{b, d} F. Lomeña^c R. Reñé^e N. Montagut^a A. Antonell^{a, d}
J.L. Molinuevo^{a, d} R. Sánchez-Valle^{a, d}

^aAlzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Department of Neurology, and Departments of ^bRadiology and ^cNuclear Medicine, Hospital Clínic, and ^dInstitut d'Investigació Biomèdica August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, and ^eDepartment of Neurology, Hospital Universitario de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

Key Words

Primary progressive aphasia · Frontotemporal dementia · Alzheimer's disease · Biological markers · GRN protein · Single photon emission computed tomography · Positron emission tomography · Magnetic resonance imaging

Abstract

Background/Aim: To investigate in variants of primary progressive aphasia (PPA) the association between current clinical and neuroimaging criteria and biochemical/genetic markers at the individual level. **Methods:** Thirty-two PPA patients were classified as non-fluent/agrammatic (nfvPPA), semantic (svPPA), or logopenic variant (lvPPA) or as unclassifiable (uPPA). In all patients, we evaluated the neuroimaging criteria (magnetic resonance imaging and/or single photon emission computed tomography/positron emission tomography) of each variant and studied serum progranulin levels, APOE genotype and Alzheimer's disease (AD)-cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers. Cases with a first-degree family history of early-onset dementia were genetically tested. **Results:** Ten of 15 (66%) nfvPPA, 5/5 (100%) svPPA and 7/7 (100%) lvPPA patients showed at least one positive neuroimaging-supported diagnostic criterion. All lvPPA and 3/5 (60%) uPPA patients presented AD-CSF biomarkers, which were absent in nfvPPA and svPPA cases. Four (27%) nfvPPA patients had dementia-causing mutations: 2 carried a GRN mutation and 2 the C9ORF72 hexanucleotide expansion. **Conclusions:** There was an excellent association between clinical criteria and neuroimaging-supported biomarkers in svPPA and lvPPA, as well as with AD-CSF biochemical markers in the lvPPA. Neuroimaging, biochemical and genetic findings in nfvPPA were heterogeneous. Incorporating biochemical/genetic markers into the PPA clinical diagnosis would allow clinicians to improve their predictions of PPA neuropathology, especially in nfvPPA and uPPA cases.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Raquel Sánchez-Valle, MD, PhD
Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit
Department of Neurology, Hospital Clínic de Barcelona
c/Villarroel 170, ES-08036 Barcelona (Spain)
E-Mail rsanchez@clinic.ub.es

Introduction

Primary progressive aphasia (PPA), first defined by Mesulam [1], is a cognitive syndrome characterized by a progressive and initially isolated language impairment of a neurodegenerative nature. Subsequently, other cognitive domains are affected and different accompanying motor system disorders may arise. Several clinical variants have been described within the PPA spectrum. However, a review of the literature reveals that different terminologies are used to describe these variants, due to the previous lack of guidelines for subtyping PPA. Recently, with the aim of improving the uniformity of case reporting and the reliability of research results in PPA, an international group of experts published a Consensus Classification of the three most accepted PPA clinical variants [2]. Patients are classified into these PPA clinical variants based on specific speech and language features, and diagnosis may be further supported by neuroimaging if the expected pattern of atrophy and/or hypometabolism or hypoperfusion is found. Thus, the non-fluent/agrammatic variant (nfvPPA) is characterized by agrammatism and/or motor speech articulatory errors attributable to an apraxia of speech (AOS) [3, 4]. Impairment of sentence comprehension for difficult syntactic constructions may also be present. Consensus neuroimaging-supported diagnostic markers are atrophy and/or functional abnormalities in the left posterior fronto-insular region. The core features of the semantic variant (svPPA) are impaired confrontation naming and single-word comprehension. Object knowledge is usually affected but repetition and motor speech are spared [5]. The clinical diagnostic criteria of svPPA are imaging-supported by circumscribed damage in the anterior temporal lobe. The logopenic variant (lvPPA) [6] is defined by hesitant speech with word-finding pauses due to impaired single-word retrieval and difficulty in sentence repetition, although object knowledge and motor aspects of speech are spared. Consensus imaging-supported diagnostic markers are predominant left posterior perisylvian or parietal abnormalities. The applicability of these clinical criteria has been demonstrated in an unselected clinical sample using an algorithm based on four key speech and language variables [7]. In addition, both structural and functional neuroimaging studies have established consistent neuroanatomical correlations in PPA variants at the group level [6, 8]. However, the neuroimaging diagnostic criteria, especially those for nfvPPA and lvPPA, have not been widely validated at the individual level in clinical practice.

In clinical-pathological correlation studies, each variant has been preferentially associated with a particular neuropathological substrate. Most cases of svPPA present a substrate of frontotemporal lobar degeneration (FTLD) with transactivation response DNA binding protein 43 (TDP-43)-positive cellular inclusions (FTLD-TDP), whereas the lvPPA is predominantly linked to Alzheimer's disease (AD) pathology [9, 10]. By contrast, the neuropathological substrate of nfvPPA is more heterogeneous. Although nfvPPA is most often associated with FTLD-tau pathology [11, 12], up to 30% of cases have been related to AD pathology [13]. FTLD-TDP pathology related to mutations in the progranulin gene (*GRN*) [9, 13] and, more recently, to the hexanucleotide expansion in *C9ORF72*, which has also been described in patients fulfilling criteria for nfvPPA [14, 15].

In recent decades, process biomarkers such as AD-cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers [16] or amyloid positron emission tomography (PET) [17, 18] have been used in research settings to improve clinical-pathological correlations. Previous data on PPA patients have highlighted the association of both AD-CSF biomarkers [19, 20] and amyloid PET [7, 8] with lvPPA, pointing to the usefulness of both biomarkers to differentiate AD PPA from non-AD cases. To date, however, only AD-CSF biomarkers have been available for clinical diagnosis in the European Union.

The aim of this study was therefore to describe in an unselected cohort of PPA patients the association between PPA clinical variants and, firstly, the consensus neuroimaging-supported diagnostic criteria and, secondly, available biochemical and genetic markers.

Materials and Methods

Participants and Clinical and Cognitive Assessment

Thirty-nine patients presenting with progressive language impairment were prospectively recruited from the Alzheimer's Disease Unit of the Hospital Clínic, Barcelona, Spain. Of these, 32 fulfilled current diagnostic criteria for PPA [2] and were clinically classified as nfvPPA, svPPA or lvPPA. Those patients who did not fulfil the consensus core or ancillary features for any of the defined variants were considered as unclassified PPA (uPPA). Seven patients who showed generalized cognitive impairment and/or relevant behavioural disturbances were excluded. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic and all participants provided written informed consent to participate in the study.

Detailed information regarding language impairment was collected using a structured form that included the semi-quantitative assessment of different speech and language features, as proposed on the Progressive Aphasia Language Scale [7], in this case adapted to Spanish-speaking patients. Each feature was scored as being absent (0), subtle or questionable (1), mild (2) or moderate or severe (3). Four patients with severe single-word repetition impairment due to AOS were excluded from the sentence repetition analysis. The assessment of those patients included in the study prior to publication of the scale was based on videotape recordings and/or a language datasheet.

All participants underwent a comprehensive cognitive assessment, as described elsewhere [21]. Language testing included several subtests from the Boston Diagnostic Aphasia Examination [22], the Boston Naming Test [23], the Controlled Oral Word Association Test (1 min, letters F, A, S) [24] and the Pyramids and Palm Trees test [25]. Five patients were unable to complete the cognitive battery because of their language disturbances.

Brain Magnetic Resonance Imaging and Single Photon Emission Computed Tomography/PET: Acquisition and Analysis

Twenty-nine patients were examined on a 3-tesla magnetic resonance imaging (MRI) scanner (Magnetom Trio Tim, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany). A high-resolution three-dimensional structural dataset was acquired. Three subjects presented exclusion criteria for MRI.

Cerebral blood flow or glucose metabolism was studied in 27 patients with single photon emission computed tomography (SPECT) or PET neuroimaging, respectively. Final axial, coronal and sagittal tomographic SPECT/PET images were visually analysed to localize regional uptake/perfusion and uptake/metabolic deficits. Brain SPECT was performed using a rotating dual-head gamma camera (Infinia Hawkeye 4, General Electric Healthcare) fitted with a low-energy and high-resolution collimator. Data acquisition started 20 min after intravenous injection of 740 MBq of ^{99m}Tc-HMPAO (Ceretec; General Electric Healthcare). For PET neuroimaging, patients fasted for at least 4 h before intravenous injection of 4.7 MBq/kg of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (FDG). At the moment of injection, they all had a blood glucose concentration below 130 mg/dl. Image acquisition began 30 min after FDG injection using a PET-CT scanner (Biograph, Siemens). A standard 11-min head/brain PET-computed tomography routine was performed. Reconstruction was performed with attenuation correction using the OSEM algorithm (16 subsets and 8 iterations), with a matrix of 128 × 128 × 64 and voxel size of 2.6 × 2.6 × 2.43 mm.

Every MRI and SPECT/PET scan was evaluated by an experienced radiologist or nuclear medicine clinician and 2 neurologists, all of whom were blinded to the patients' clinical data. For each PPA variant, we assessed in all patients the presence or absence of three imaging-supported diagnostic biomarkers: (a) predominant atrophy and/or hypoperfusion/hypometabolism in the left posterior fronto-insular region; (b) predominant atrophy and/or hypoperfusion/hypometabolism in the anterior temporal lobe, and (c) predominant atrophy and/or hypoperfusion/hypometabolism in the left posterior perisylvian or parietal region. When brain damage was generalized or affected other cortical regions, the imaging study was considered unclassifiable.

Table 1. Summary of demographic features and severity scores for PALS variables of the 32 PPA patients

	nfvPPA (n = 15)	svPPA (n = 5)	lvPPA (n = 7)	uPPA (n = 5)	Omnibus significance
Demographics					
Age at onset, years	63±7.8	62.8±9.6	64.2±7.5	65.4±3.9	NS
Disease duration, years	3.6±2.9	3.2±1.7	3.2±2.3	2.8±1.7	NS
Male gender	7 (47%)	3 (60%)	0 (0)	3 (60%)	NS
Education, years	11.3±5.9	10.8±4.2	8.5±4.7	9.4±5.1	NS
PALS variables					
Motor speech disorder (AOS)	2±0.8 ^{***, b, c}	0±0	0±0	0.8±1.0	<0.001
Agrammatism	1.6±0.7 ^{***, b, c}	0±0	0±0	0.8±0.4 ^{*, b, c}	<0.001
Naming	1±2.2	3±0 ^{**, a, c}	1.4±1.1	1.7±0.5 ^{*, a}	<0.01
Single-word comprehension	0±0	1±0 ^{***, a, c}	0±0	0.8±0.4 ^{*, a, c}	<0.001
Single-word repetition	1.2±1.4	0±0	0.7±0.7	0.8±0.8	NS
Sentence comprehension	0.2±0.5	0.4±0.5	0.4±0.7	0.8±1.3	NS
Sentence repetition	0.9±1.1	0±0	2.4±0.7 ^{***, a, b}	1.4±1.5	<0.01

Figures are means ± SD or number with percentages in parentheses. NS = Not significant; PALS = Progressive Aphasia Language Scale. Asterisks denote significantly impaired at * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 (Mann-Whitney test). Superscript letters denote comparison with nfvPPA (a), svPPA (b) and lvPPA (c). Four patients with severe single-word repetition impairment were excluded from the analysis of sentence repetition.

Biochemical and Genetic Markers

Blood was collected from all subjects for determination of progranulin serum levels, *APOE* genotyping and mutational screening when the patient reported an autosomal dominant or familial (first-degree relative) early-onset dementia. A commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to assess serum progranulin levels (Adipogen, South Korea). *APOE* genotyping was performed by PCR amplification and *HhaI* restriction enzyme digestion. Mutational screening for *GRN* (exons 1–13) and *MAPT* (exons 1 and 9–13) genes was performed as previously described [26]. *C9ORF72* GGGGCC hexanucleotide repeat expansion was tested with a repeat-primed PCR as described elsewhere [27]. Fragment length analysis was performed on an ABI 3130XL genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA), and data were analysed using GeneMapper software (version 4.0, ABI).

Twenty-six patients underwent a lumbar puncture to study CSF biomarkers related to AD pathology: amyloid- β_{1-42} ($A\beta_{42}$), total tau (T-tau) and phosphorylated tau at threonine 181 (P-tau). Biomarkers were measured by ELISA kits (Innogenetics, Ghent, Belgium) following manufacturer instructions and were considered suggestive of AD pathology if $A\beta_{42}$ <500 pg/ml and T-tau >450 pg/ml and/or P-tau >75 pg/ml [16, 28] and/or the $A\beta_{42}$ /P-tau ratio <6.43 [29].

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with PASW 18.0 (IBM Corp.). Quantitative data are expressed as mean and SD. Due to the small size of some of the groups analysed and the non-parametric distribution of several quantitative variables, the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis test was used to compare quantitative variables between the four PPA subtype groups. Categorical data were compared by means of Fisher's exact test. The significance level for all tests was set at p < 0.05.

Results

PPA Classification: Demographic, Clinical and Cognitive Features

Fifteen patients fulfilled clinical research criteria for nfvPPA, 5 for svPPA and 7 for lvPPA. Five patients were considered unclassifiable according to established criteria. There were no differences between the groups in terms of age at onset, sex, years of education,

Table 2. Quantitative neuropsychological data

	nfvPPA (n = 13)	svPPA (n = 4)	lvPPA (n = 6)	uPPA (n = 4)	Omnibus significance
Verbal memory (recognition CERAD)/20	18.2±1.7	15.2±1.8 ^{*, a}	16±3.2	17.3±3	NS
Visual memory (CERAD)/11	7.3±4.0	9.7±1.5	5.5±3.5 ^{*, b}	3.7±4.7	NS
Figure copy/11	9.1±2.4	11±0	9.8±1.9	8.5±3.5	NS
VOSP letters/20	19±1.5	20±0	18.6±1.6	18.5±2.1	NS
Verbal fluency, animals/min	11.9±5.0	7.8±4.6	11.4±6.5	8.2±3.7	NS
Trail Making Test part A (time), s	68±34.6	45±15.5	77.2±41.4	129.7±52.3 ^{*, a}	<0.05
Digits forward/8	6±1.3	5.6±0.5	6±0.8	6±0	NS
Letter fluency (F, A, S), words/min	13±8	32±20 ^{*, a}	15±13	18.2±17	NS
Boston Naming Test/60	49.2±8.1	14.2±8.5 ^{***, a, c, d}	39.5±12 ^{*, a}	36.2±8.7 ^{*, a}	<0.001
Comprehension BDAE/15	14±0.9	14.6±0.5	14.5±0.5	14.2±0.9	NS
Pyramids and Palm Trees test/52	49.03±2	47±0.5	50.2±1.7	41.2±10.7	NS
Word discrimination, BDAE/72	64.5±7	68.7±1.8	70.2±2.8	71.6±0.5	NS

Figures are means ± SD. NS = Not significant; CERAD = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; VOSP = Visual Object and Space Perception Battery; BDAE = Boston Diagnosis Aphasia Examination. Asterisks denote significantly impaired at * p < 0.05, *** p < 0.001 and ⁺ p < 0.1, i.e. marginal significance (Mann-Whitney test). Super-script letters denote comparison with nfvPPA (^a), lvPPA (^c) and uPPA (^d).

and/or disease duration from symptom onset (table 1). Impaired word-finding was the most frequent first symptom reported (n = 20, 62%, p < 0.05), followed by motor speech difficulties (n = 9, 28%, p > 0.05). Only 1 nfvPPA patient (6%) presented grammatical abnormalities, specifically, difficulties with verb conjugation as an isolated initial symptom. Other early symptoms were phonemic paraphasias in 1 lvPPA patient (14%) and impaired comprehension of single-word meaning in an svPPA patient (20%). As predicted, nfvPPA patients had higher mean scores on motor speech assessment and agrammatism (table 1). svPPA patients presented the greatest deficits in confrontation naming and single-word comprehension, whereas sentence comprehension was relatively spared in comparison with single-word comprehension. lvPPA patients had the greatest difficulty with sentence repetition. Regarding the 5 uPPA cases, 1 of them presented spontaneous speech which resembled that of lvPPA, with slow speech, word-finding pauses and anomia, but with sentence repetition and single-word comprehension spared. The other 4 uPPA patients showed impairments in confrontation naming, object knowledge and single-word comprehension. Although none of these patients presented surface dyslexia or dysgraphia, grammar (in 3 patients), motor speech (in 2 patients) and/or sentence repetition (in 3 patients) were also impaired, rendering them unclassifiable using consensus criteria or Leyton's algorithm.

Table 2 presents quantitative data from the first formal cognitive assessment. Results regarding performance on non-language neuropsychological tests in PPA can be misinterpreted due to the level of aphasia, and they must therefore be interpreted with caution. svPPA patients showed the greatest impairment on the verbal memory test. Scores on visual memory tests were lower among lvPP and uPPA patients, and the latter also performed worse on the executive function tests. Visuo-perceptual skills were intact in all patients.

Clinical signs of parkinsonism or motor neuron disease were not present in any PPA patient at inclusion. Eleven (34%) PPA patients reported a family history of cognitive impairment in at least 1 first-degree relative, but only 3 nfvPPA patients had a first-degree family history of early-onset dementia. No PPA patient with familial dementia had relatives affected by motor neuron disease.

Table 3. Frequency of positive imaging-supported biomarkers and AD-CSF biochemical markers in PPA patients

	nfvPPA (n = 15)	svPPA (n = 5)	lvPPA (n = 7)	uPPA (n = 5)
MRI	10/13 (76%)	5/5 (100%)	4/7 (57%)	A 2/4 (50%); B 1/4 (25%)
SPECT/PET	9/13 (69%)	2/2 (100%)	6/7 (86%)	A 2/4 (50%); B 2/4 (50%)
One positive neuroimaging biomarker	10/15 (66%)	5/5 (100%)	7/7 (100%)	
Both positive neuroimaging biomarkers	9/11 (81%)	2/2 (100%)	3/7 (43%)	
Positive AD-CSF biomarkers	0/11	0/3	7/7 (100%)	3/5 (60%)

Predominant atrophy and/or hypoperfusion/hypometabolism in: A = left posterior fronto-insular region; B = left posterior perisylvian-parietal region. Figures are numbers with percentages in parentheses.

Table 4. Biochemical and genetic marker data

	nfvPPA (n = 15)	svPPA (n = 5)	lvPPA (n = 7)	uPPA (n = 5)	p value
Progranulin serum levels, ng/ml	122±38 ^{**} , ^c	151±46	155±20	139±32	NS
APOE ε4, n	2 (14%)	0	3 (42%)	1 (20%)	NS
	nfvPPA (n = 12)	svPPA (n = 3)	lvPPA (n = 6)	uPPA (n = 5)	
Aβ ₄₂ , pg/ml	654±171 ^{*,c}	819±294 ^{*,c}	340±71	485±123 ^{*,c}	<0.001
T-tau, pg/ml	298±131 ^{**} , ^c	304±118 ^{*,c}	880±546	429±279	<0.01
P-tau ₁₈₁ , pg/ml	81.3±110 ^{**} , ^c	45.2±7.1 ^{*,c}	129.2±61.7	78.2±37.3	NS

Figures are means ± SD. NS = Not significant. Asterisks denote significantly impaired at * p < 0.05, ** p < 0.01 and ^c p < 0.1, i.e. marginal significance (Mann-Whitney test). Superscript letter denotes significantly impaired relative to lvPPA (^c).

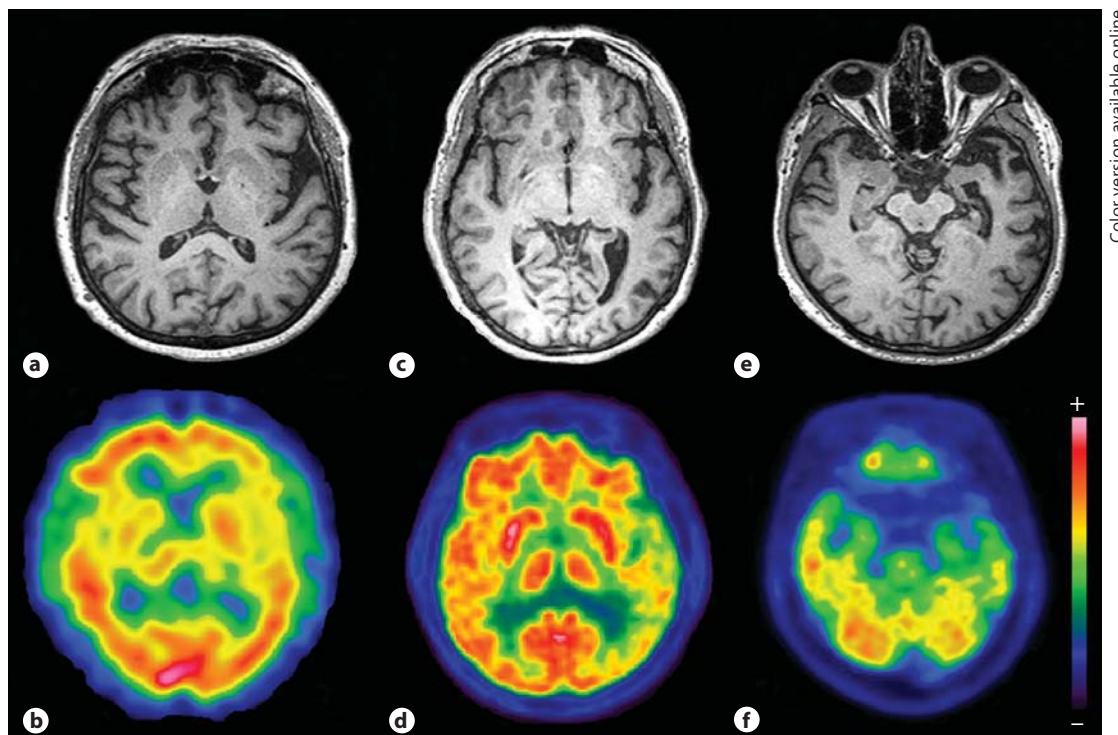
Neuroimaging Biomarkers: MRI and SPECT/PET

Results of neuroimaging biomarkers are summarized in table 3, while detailed individual results for all subjects are available online in the online supplementary table 1 (for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000346289). All svPPA and lvPPA patients showed at least 1 positive neuroimaging-supported diagnostic biomarker, whereas this was the case for only 66% of nfvPPA patients.

Regarding those patients for whom both structural and functional neuroimaging data were available, 81% of nfvPPA and 100% of svPPA patients presented both positive biomarkers, showing prominent atrophy and hypoperfusion/hypometabolism in the left posterior fronto-insular region and in the anterior temporal lobe, respectively (fig. 1). lvPPA patients were less likely to have both positive neuroimaging biomarkers (43%), and although functional imaging abnormalities (86%) seemed to be more common than structural ones (57%) in this group, the difference was not significant.

Biochemical and Genetic Biomarkers

Group mean values for biochemical and genetic markers are summarized in table 4. AD-CSF biomarkers were studied in 26 patients (12 nfvPPA, 3 svPPA, 6 lvPPA and 5 uPPA). All lvPPA and 60% of uPPA patients showed an AD-CSF biomarker profile, but this was not the case for any patient in the other groups. The frequency of APOE ε4 carriers was not signifi-



Color version available online

Fig. 1. Representative axial brain MRI and PET images from single non-fluent/agrammatic (a, b), logopenic (c, d) and semantic (e, f) PPA patients. The non-fluent/agrammatic variant of PPA is characterized by predominant atrophy and hypometabolism in the left posterior fronto-insular region, the semantic variant by predominant atrophy and hypometabolism in the anterior temporal lobe and the logopenic variant by predominant atrophy and hypometabolism in the left posterior perisylvian or parietal region.

cantly different between groups ($p = 0.27$). Mean serum progranulin levels were lower in nfvPPA patients, but the differences were not significant ($p = 0.22$). Two nfvPPA patients presented low progranulin levels (53.3 and 92.5 ng/ml), and the analysis of the *GRN* gene revealed *p.C366fsX1* and *p.C139R* mutations, respectively [26]. The *p.C366fsX1* carrier presented with mild agrammatism. At follow-up, she showed rapid language impoverishment with AOS and sentence comprehension impairment. This patient had a first-degree family history of early-onset dementia and both her MRI and FDG-PET scans were compatible with nfvPPA. The *p.C139R* carrier, with no family history, presented with isolated AOS but developed generalized cognitive decline and atypical parkinsonism 2 years after inclusion. MRI neuroimaging of this patient showed generalized atrophy.

The other 2 nfvPPA patients with a first-degree family history of early-onset dementia but who presented normal serum progranulin levels were screened for mutations in *MAPT* and *C9ORF72*. The *C9ORF72* GGGGCC hexanucleotide repeat expansion was found in both of them. One nfvPPA carrier presented with language problems at age 52 and developed clinical signs of motor neuron disease during follow-up. The other patient began with language impairment at 50 years old and developed behavioural changes typical of frontotemporal dementia (FTD) 1 year after inclusion. Both of these patients presented non-specific neuroimaging findings.

Discussion

This study is based on an unselected cohort of 32 patients presenting with a primary progressive language disorder. Recent consensus criteria for PPA and its clinical variants were applied with the aim of describing the association between these clinical variants and, firstly, neuroimaging-supported diagnostic criteria and, secondly, AD-CSF and genetic biomarkers in patients meeting the criteria for PPA. Application of the consensus classification led to patients being categorized into four clinical groups: 46.8% fulfilled criteria for nfvPPA, 15.6% for svPPA, 21.8% for lvPPA and 15.6% were uPPA cases at the time of inclusion. Disease duration was similar across these groups, and the analysis of available biomarkers confirmed the physiopathological and biological differences between the clinical variants of PPA.

From the clinical point of view, word-finding difficulty, with subsequent impaired naming, was the commonest first symptom reported in our cohort. This is a usual leading symptom in all PPA variants and covers a wide range of clinical phenomena [30]. In our cohort, anomia, as measured on the semi-quantitative clinical scale, was significantly more severe in cases of svPPA than in the other 2 variants. Accordingly, svPPA patients obtained the lowest scores on the Boston Naming Test, as compared with nfvPPA and lvPPA patients. It should be noted, however, that anomia is not considered a key feature in the algorithm developed by Leyton et al. [7] as it failed to show good discriminatory value and depends greatly on disease severity. As predicted, each variant was associated with significantly higher scores in its key language or speech feature. With respect to cognitive testing, svPPA patients performed worse on episodic memory tests, although their day-to-day memory was preserved. In this regard, the effect of their semantic deficits on performance cannot be ruled out [31].

Consensus criteria play a crucial role in unifying research findings and subtyping prospective PPA cohorts from different centres. In our series, although the majority of PPA patients could be classified into 3 PPA variants, some patients were unclassifiable because their neurolinguistic deficits extended beyond the stipulated clinical criteria for a single variant: 15.6% cases met core criteria for more than 1 variant and 1 case presented only 1 isolated core criterion for a single variant. Other studies conducted since the publication of the consensus criteria have reported similar percentages of unclassifiable patients with mixed PPA features [32, 33]. The possibility that the overlapping features were attributable to an advanced form of the disease with a greater burden of language deficits was not supported by either the global assessment or the disease duration. Three uPPA patients could have been classified as mixed variant PPA, as proposed by Mesulam et al. [32, 34], because of the presence of word comprehension impairments and agrammatism. Two of these patients, as did some of the cases reported by Mesulam, also presented altered sentence repetition. Given the overall neuropsychological results (with a more pronounced impairment of other extralinguistic domains, particularly on visual memory tests and the Trail Making Test part A), and taking into account the AD-CSF results, we would argue that the reason for the overlapping language features in 50% of uPPA patients is related to the presence of an underlying AD.

It is also important to consider the ongoing debate about whether patients with predominant or isolated AOS without clear agrammatism should be classified in the nfvPPA group or not [32, 35]. Clinicopathological series have highlighted that AOS is more likely to have underlying brain 4R-tau pathology, whereas some patients with pure agrammatism without AOS could present FTLD-TDP pathology [12, 36]. In our cohort, we followed consensus criteria and both types of patients were included in the nfvPPA group. However, only 1 case presented with isolated agrammatism, whereas almost all the nfvPPA patients (14 of 15)

showed a combination of varying degrees of AOS and grammatical errors and/or oversimplification of phrases.

With respect to neuroimaging findings, group studies using semi-quantitative techniques such as voxel-based morphometry have established consistent neuroanatomical correlations in PPA variants [6]. However, even if structural and functional imaging in PPA patients usually shows asymmetrical abnormalities within the language circuits located in the dominant hemisphere, it can be difficult in clinical practice to apply the ‘three variants’ neuroimaging criteria at the individual level, particularly in nfvPPA and lvPPA patients, where cases with an unremarkable MRI have been reported in the literature [10]. We interpret these discrepancies in terms of the different sensitivity of the semi-quantitative group-based analyses performed in research studies as compared with the qualitative analysis of individual clinical data. In addition, clinical heterogeneity cannot be ruled out. In the present study, all 5 svPPA patients presented a positive structural neuroimaging biomarker, suggesting, in agreement with previous reports, that severe anterior temporal involvement in svPPA, even in the mildly symptomatic stage of the disease [6, 37], makes anterior temporal atrophy an excellent key feature which supports the diagnosis of this variant at the individual level in clinical practice. A further point is that this focal anatomical involvement is known to be related to the progressive loss of semantic knowledge in svPPA [5] and, as a result, poor comprehension of single words and severe progressive anomia are obvious manifestations of svPPA. Conversely, the neuroimaging-supported criteria were not completely met in the nfvPPA and lvPPA groups, even though there were no differences in disease duration with respect to svPPA patients. These findings suggest that the pattern of atrophy/hypometabolism which has been clearly shown in various group-based studies is less useful at the individual level in these variants.

While all lvPPA patients showed at least 1 positive neuroimaging biomarker, fewer than half of them presented both neuroimaging markers. Although the difference was not significant, functional neuroimaging seemed to be more sensitive than MRI at detecting a focal pattern of left posterior perisylvian or parietal region involvement in lvPPA. Previous structural [6] and functional neuroimaging studies [8, 38] have emphasized the involvement of the left temporoparietal region in lvPPA at the group level. Furthermore, the most striking feature for all our lvPPA patients, namely a severe difficulty repeating sentences, which is caused by a phonological short-term memory deficit, has been related anatomically to the involvement of the temporoparietal junction [39].

Regarding nfvPPA, previous findings from structural and functional group studies have clearly shown grey matter atrophy/hypometabolism in the left inferior frontal and insular region [6, 40]. Although incorporating both neuroimaging biomarkers in this group improved the rate of imaging-supported diagnosis, the anatomical distribution of brain damage in nfvPPA exhibited, on clinical neuroimaging, a weaker association with clinical criteria at the individual level than was the case in the other 2 variants considered in our series. MRI seemed to be as sensitive as functional neuroimaging when indicating the left posterior fronto-insular region as the preferential anatomical site of pathology. Interestingly, a longitudinal study examining the progression of cortical thickness in PPA showed extension of the atrophy from the fronto-insular region to the prefrontal cortex, temporoparietal cortex and the anterior temporal lobe [41]. Consequently, in nfvPPA the anatomical distribution of brain atrophy involving the perisylvian region may sometimes overlap with that observed in lvPPA as the disease progresses, making diagnosis by visual inspection a challenge in advanced cases.

All PPA variants have been related to AD, although in a very different proportion, with lvPPA being the most frequent variant [10, 13]. Accordingly, all our lvPPA patients presented AD-CSF biomarkers, this being consistent with previous studies showing the typical AD-CSF biomarker profile [18, 19]. The idea that AD pathology underlies lvPPA has been further strengthened by studies showing amyloid deposition on PET-Pittsburgh compound B scans

in logopenic patients [7, 8]. Furthermore, recent reports on AD-CSF biomarkers have confirmed different CSF biomarker profiles for AD, FTD and PPA [42]. The detection of underlying AD pathology in these patients is clinically relevant for treatment and prognosis and, ultimately, for patient selection in clinical trials. In this regard, the AD-CSF results obtained in the present cohort suggest that 60% of uPPA could be related to the presence of underlying AD pathology. Conversely, none of the svPPA or nfvPPA cases presented an AD-CSF profile. Previous reports involving amyloid PET neuroimaging have usually reported a small percentage of positive cases within these two groups. We believe there to be two reasons for these discrepancies. First, our criteria for the AD-CSF profile required not only diminished $A\beta_{42}$, supportive of amyloidosis, but also elevated T-tau, P-tau or $A\beta_{42}/P$ -tau, supporting neuronal injury related to AD pathology. In this regard, 1 nfvPPA and *p.C139R* carrier presented reduced $A\beta_{42}$ with normal injury markers, which could be interpreted as coexisting amyloidosis related to aging. Secondly, 16% of our PPA patients were considered unclassifiable according to the recent criteria, but they could have been previously classified as non-fluent or logopenic, and 60% of them presented an AD-CSF profile.

With respect to genetic findings, it should be underlined that while familial FTD accounts for 10% of cases, familial PPA is usually considered infrequent [43]. Three of our nfvPPA patients had a first-degree relative with early-onset dementia and were shown upon testing to be carriers of a dementia-causing mutation, supporting the idea that genetic alterations are more frequent in nfvPPA than in lvPPA or svPPA. Another nfvPPA patient with low serum progranulin levels but no family history of dementia in first- or second-degree relatives also showed a *GRN* mutation. This finding supports the idea that decreased serum progranulin levels are a good screening test to detect *GRN* mutation carriers [26], even in the absence of a family history of disease. The other 2 familial nfvPPA cases presented the expanded hexanucleotide *C9ORF72* mutation. Language dysfunction, nfvPPA or mixed PPA is a common presentation of *GRN* mutations [44]. The frequency of language disturbances at onset in *C9ORF72* mutation carriers is variable across series, with 9–27% of patients presenting with nfvPPA [14, 15]. With respect to *APOE*, and as expected, the highest rate of *APOE* $\epsilon 4$ positives was found among lvPPA patients [6], although the difference was not significant, probably due to sample size. Notably, more than half of our lvPPA patients were *APOE* $\epsilon 4$ negative, suggesting, as in a previous report, that the frequency of *APOE* $\epsilon 4$ carriers could be lower in patients with a non-memory phenotype of AD than in AD patients with the typical memory phenotype [45].

The present study has two main limitations. First, the sample size is small, although it is not very different from that described in other single-centre studies in a clinical dementia unit setting. Second, it would be desirable to have neuropathological results with which to perform clinicopathological correlations. In this regard, above and beyond the presence of AD pathology in patients with an AD-CSF profile and FTLD-TDP-43 in those patients with mutations in *PGRN* or *C9ORF72* hexanucleotide expansion, the neuropathological prediction in each patient could only be based on previous studies rather than on our own data, as discussed in the text.

In conclusion, we found an excellent association between clinical and neuroimaging-supported diagnostic criteria in svPPA and lvPPA. AD-CSF markers were associated with lvPPA, as well as with some cases of uPPA. Neuroimaging, biochemical and genetic markers suggested a heterogeneous substrate in nfvPPA. These findings indicate that incorporating the study of biochemical and genetic markers into the assessment of PPA could improve the neuropathological prediction of some such cases, especially nfvPPA and uPPA. Further studies with larger samples, longitudinal follow-up and post mortem assessments are now needed in order to study the biological correlates of biomarkers in PPA patients, as well as to incorporate new criteria for other PPA subtypes or to improve the neuropathological prediction of each recognized subtype.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants to Dr. José Luis Molinuevo (Instituto de Salud Carlos III, CSD2010-00045), Lorena Rami (Instituto de Salud Carlos III, CP 08/00147) and Dr. Albert Lladó (Instituto de Salud Carlos III, PI11/00234).

References

- Mesulam MM: Primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2001;49:425–432.
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, Ogar JM, Rohrer JD, Black S, Boeve BF, Manes F, Dronkers NF, Vandenberghe R, Rascovsky K, Patterson K, Miller BL, Knopman DS, Hodges JR, Mesulam MM, Grossman M: Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011; 76:1006–1014.
- Grossman M: The non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia. *Lancet Neurol* 2012;11: 545–555.
- Ogar JM, Dronkers NF, Brambati SM, Miller BL, Gorno-Tempini ML: Progressive nonfluent aphasia and its characteristic motor speech deficits. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2007;21:S23–S30.
- Hodges JR, Patterson K, Oxbury S, Funnell E: Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain* 1992;115:1783–1806.
- Gorno-Tempini ML, Dronkers NF, Rankin KP, Ogar JM, La Phengrasamy BA, Rosen HJ, Johnson JK, Weiner MW, Miller BL: Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2004; 55:335–346.
- Leyton CE, Villemagne VL, Savage S, Pike KE, Ballard KJ, Piguet O, Burrell JR, Rowe CC, Hodges JR: Subtypes of progressive aphasia: application of the International Consensus Criteria and validation using beta-amyloid imaging. *Brain* 2011;134:3030–3043.
- Rabinovici GD, Jagust WJ, Furst AJ, Ogar JM, Racine CA, Mormino EC, O'Neil JP, Lal RA, Dronkers NF, Miller BL, Gorno-Tempini ML: Abeta amyloid and glucose metabolism in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2008;64:388–401.
- Snowden J, Neary D, Mann D: Frontotemporal lobar degeneration: clinical and pathological relationships. *Acta Neuropathol* 2007;114:31–38.
- Mesulam M, Wicklund A, Johnson N, Rogalski E, Léger GC, Rademaker A, Weintraub S, Bigio EH: Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2008;63:709–719.
- Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Munoz DG: The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain* 2005;128:1996–2005.
- Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, Whitwell JL, Layton KF, Parisi JE, Hauser MF, Witte RJ, Boeve BF, Knopman DS, Dickson DW, Jack CR Jr, Petersen RC: Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. *Brain* 2006;129:1385–1398.
- Knibb JA, Xuereb JH, Patterson K, Hodges JR: Clinical and pathological characterization of progressive aphasia. *Ann Neurol* 2006;59:156–165.
- Snowden JS, Rollinson S, Thompson JC, Harris JM, Stopford CL, Richardson AM, Jones M, Gerhard A, Davidson YS, Robinson A, Gibbons L, Hu Q, DuPlessis D, Neary D, Mann DM, Pickering-Brown SM: Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations. *Brain* 2012; 135:693–708.
- Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, Yeatman T, Warrington EK, Schott JM, Fox NC, Rossor MN, Hardy J, Collinge J, Revesz T, Mead S, Warren JD: Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012;135:736–750.
- Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, Rosso SM, Van Elk EJ, Van Kamp GJ, Van Swieten JC, Scheltens P: Amyloid beta(1–42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology* 2004;62:1580–1584.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Långström B: Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55:306–319.
- Herholz K, Ebmeier K: Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2011;10:667–670.
- Rohrer JD, Ridgway GR, Crutch SJ, Hailstone J, Goll JC, Clarkson MJ, Mead S, Beck J, Mummery C, Ourselin S, Warrington EK, Rossor MN, Warren JD: Progressive logopenic/phonological aphasia: erosion of the language network. *Neuroimage* 2010;49:984–933.
- Rohrer JD, Rossor MN, Warren JD: Alzheimer's pathology in primary progressive aphasia. *Neurobiol Aging* 2012;33:744–752.
- Rami L, Gómez-Ansón B, Sánchez-Valle R, Bosch B, Monte GC, Lladó A, Molinuevo JL: Longitudinal study of amnesic patients at high risk for Alzheimer's disease: clinical, neuropsychological and magnetic resonance spectroscopy features. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007;24:402–410.

- 22 Goodglass H, Kaplan E: The Assessment of Aphasia and Related Disorders, ed 2. Philadelphia, Lea and Febiger, 1983.
- 23 Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S: Boston Naming Test. Philadelphia, Lea and Febiger, 1983.
- 24 Borkowski JG, Benton AL, Speen O: Word fluency and brain damage. *Neuropsychologia* 1967;5:135–140.
- 25 Howard D, Patterson K: Pyramids and Palm Trees: A Test of Semantic Access from Pictures and Words. Bury St Edmunds, Thames Valley Publishing Company, 1992.
- 26 Antonell A, Gil S, Sanchez-Valle R, Balasa M, Bosch B, Prat MC, Chiollaz AC, Fernández M, Yagüe J, Molinuevo JL, Lladó A: Serum progranulin levels in patients with frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease: detection of GRN mutations in a Spanish cohort. *J Alzheimers Dis* 2012;31:581–591.
- 27 Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviihta VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ: A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011;72:257–268.
- 28 Antonell A, Fortea J, Rami L, Bosch B, Balasa M, Sánchez-Valle R, Iranzo A, Molinuevo JL, Lladó A: Different profiles of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers in controls and subjects with subjective memory complaints. *J Neural Transm* 2011;118:259–262.
- 29 Welge V, Fiege O, Lewczuk P, Mollenhauer B, Esselmann H, Klafki HW, Wolf S, Trenkwalder C, Otto M, Kornhuber J, Wiltfang J, Bibl M: Combined CSF tau, p-tau181 and amyloid-beta 38/40/42 for diagnosing Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009;116:203–212.
- 30 Rohrer JD, Knight WD, Warren JE, Fox NC, Rossor MN, Warren JD: Word-finding difficulty: a clinical analysis of the progressive aphasia. *Brain* 2008;131:8–38.
- 31 Hodges JR: Alzheimer's disease and the frontotemporal dementias: contributions to clinico-pathological studies, diagnosis and cognitive neuroscience. *J Alzheimers Dis* 2012, E-pub ahead of print.
- 32 Mesulam MM, Wieneke C, Thompson C, Rogalski E, Weintraub S: Quantitative classification of primary progressive aphasia at early and mild impairment stages. *Brain* 2012;135:1537–1553.
- 33 Sajjadi SA, Patterson K, Arnold RJ, Watson PC, Nestor PJ: Primary progressive aphasia: a tale of two syndromes and the rest. *Neurology* 2012;78:1670–1677.
- 34 Mesulam M, Wieneke C, Rogalski E, Cobia D, Thompson C, Weintraub S: Quantitative template for subtyping primary progressive aphasia. *Arch Neurol* 2009;66:1545–1551.
- 35 Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, Machulda MM, Senjem ML, Master AV, Lowe VJ, Jack CR Jr, Whitwell JL: Characterizing a neurodegenerative syndrome: primary progressive apraxia of speech. *Brain* 2012;135:1522–1536.
- 36 Deramecourt V, Lebert F, Debachy B, Mackowiak-Cordoliani MA, Bombois S, Kerdraon O, Buée L, Maurage CA, Pasquier F: Prediction of pathology in primary progressive language and speech disorders. *Neurology* 2010;74:42–49.
- 37 Yamamoto R, Iseki E, Higashi S, Murayama N, Minegishi M, Sato K, Hino H, Fujisawa K, Kosaka K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Yoshida M, Hashizume Y, Arai H: Neuropathological investigation of regions responsible for semantic aphasia in frontotemporal lobar degeneration. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009;27:214–223.
- 38 Nestor PJ, Balan K, Cheow HK, Fryer TD, Knibb JA, Xuereb JH, Hodges JR: Nuclear imaging can predict pathologic diagnosis in progressive nonfluent aphasia. *Neurology* 2007;68:238–239.
- 39 Gorno-Tempini ML, Brambati SM, Ginex V, Ogar J, Dronkers NF, Marcone A, Perani D, Garibotto V, Cappa SF, Miller BL: The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia. *Neurology* 2008;71:1227–1234.
- 40 Rohrer JD, Warren JD, Modat M, Ridgway GR, Douiri A, Rossor MN, Ourselin S, Fox NC: Patterns of cortical thinning in the language variants of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2009;72:1562–69.
- 41 Rogalski E, Cobia D, Harrison TM, Wieneke C, Weintraub S, Mesulam MM: Progression of language impairments and cortical atrophy in subtypes of primary progressive aphasia. *Neurology* 2011;76:1804–1810.
- 42 Bibl M, Mollenhauer B, Lewczuk P, Esselmann H, Wolf S, Otto M, Kornhuber J, Rütger E, Wiltfang J: Cerebrospinal fluid tau, p-tau 181 and amyloid-β38/40/42 in frontotemporal dementias and primary progressive aphasia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2011;31:37–44.
- 43 Goldman JS, Rademakers R, Huey ED, Boxer AL, Mayeux R, Miller BL, Boeve BF: An algorithm for genetic testing of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2011;76:475–483.
- 44 Le Ber I, Camuzat A, Hannequin D, Pasquier F, Guedj E, Rovelet-Lecrux A, Hahn-Barma V, van der Zee J, Clot F, Bakchine S, Puel M, Ghanim M, Lacomblez L, Mikol J, Deramecourt V, Lejeune P, de la Sayette V, Belliard S, Vercelletto M, Meyrignac C, Van Broeckhoven C, Lambert JC, Verpillat P, Campion D, Habert MO, Dubois B, Brice A: Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study. *Brain* 2008;131:732–746.
- 45 Van der Flier WM, Schooneboom SNM, Pijnenburg YAL, Fox NC, Scheltens P: The effect of APOE genotype on clinical phenotype in Alzheimer's disease. *Neurology* 2006;67:526–527.

Trabajo número 2

Serum progranulin levels in FTL D and AD patients: detection of GRN mutations in a Spanish cohort.

Antonell A, Gil-Navarro S, Sánchez-Valle R, Balasa M, Bosch B, Chiollaz A, Fernández M, Rami L, Molinuevo JL, Lladó A.

Journal of Alzheimers Disease 2012;31:581-591

IF 4.174 (JCR 2012); Q2 Neurosciences

Serum Progranulin Levels in Patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer's Disease: Detection of *GRN* Mutations in a Spanish Cohort

Anna Antonell^a, Silvia Gil^a, Raquel Sánchez-Valle^a, Mircea Balasa^a, Beatriz Bosch^a, M^a Carmen Prat^b, Anne-Cécile Chiollaz^a, Manel Fernández^a, Jordi Yagüe^c, José Luis Molinuevo^a and Albert Lladó^{a,*}

^a*Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

^b*Cognitive Disorders Unit, Consorci Sanitari Parc Taulí, Sabadell, Spain*

^c*Department of Immunology, Hospital Clínic, Institut de Recerca Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

Handling Associate Editor: Christine van Broeckhoven

Accepted 23 April 2012

Abstract. Progranulin gene (*GRN*) mutations cause frontotemporal lobar degeneration (FTLD) with TDP43-positive inclusions, although its clinical phenotype is heterogeneous and includes patients classified as behavioral variant-FTLD (bvFTLD), progressive non-fluent aphasia (PNFA), corticobasal syndrome, Alzheimer's disease (AD), or Parkinson's disease (PD). Our main objective was to study if low serum progranulin protein (PGRN) levels may detect *GRN* mutations in a Spanish cohort of patients with FTLD or AD. Serum PGRN levels were measured in 112 subjects: 17 bvFTLD, 20 PNFA, 4 semantic dementia, 34 sporadic AD, 9 AD-*PSEN1* mutation carriers, 10 presymptomatic-*PSEN1* mutation carriers, and 18 control individuals. We detected 5 patients with PGRN levels below 94 ng/mL: two of them had a clinical diagnosis of bvFTLD, two of PNFA, and one of AD. The screening for *GRN* mutations detected two probable pathogenic mutations (p.C366fsX1 and a new mutation: p.V279GfsX5) in three patients and one mutation of unclear pathogenic nature (p.C139R) in one patient. The other patient showed a normal *GRN* sequence but carried a *PRNP* gene mutation. We observed no differences in serum PGRN levels between controls (mean = 145.5 ng/mL, SD = 28.5) and the other neurodegenerative diseases, except for the carriers of pathological *GRN* gene mutations (mean = 50.5 ng/mL, SD = 21.2). Null *GRN* mutation carriers also showed lower serum PGRN levels than the patient who was a carrier of p.C139R (92.3 ng/mL) and the one who was a carrier of the *PRNP* mutation (76.9 ng/mL). In conclusion, we detected *GRN* null mutations in patients with severely reduced serum PGRN levels, but not in patients with slightly reduced PGRN levels.

Keywords: Alzheimer's disease, biomarker, exon skipping, frameshift, frontotemporal lobar degeneration, mutation, progranulin, serum, splicing

INTRODUCTION

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) is a neurodegenerative disease characterized by focal atrophy of the frontal and/or temporal lobes. The criteria proposed by Neary et al. [1] describe three clinical

*Correspondence to: Albert Lladó, MD, PhD, Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Hospital Clínic, C/Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275785; Fax: +34 932275783; E-mail: allado@clinic.ub.es.

presentations of FTLD: frontotemporal dementia or behavioral variant-FTLD (bvFTLD), progressive non-fluent aphasia (PNFA), and semantic dementia (SD). Around 40% of FTLD cases have a familial history of the disease, and the majority of these cases show an autosomal dominant pattern of inheritance [2]. However, FTLD is genetically heterogeneous and multiple genes have been implicated in its pathogenesis; the vast majority of monogenic FTLD cases are caused by mutations in the Progranulin gene (approved HUGO gene symbol *GRN*; MIM# 138945) and Microtubule-associated Tau-protein gene (*MAPT*), or the recently described Chromosome 9 open reading frame 72 gene (*C9ORF72*) [3–7].

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of degenerative dementia in developed countries [8]. The typical clinical profile starts with an episodic memory dysfunction and then progresses to other cognitive domains. Monogenic AD represents less than 1% of the cases and is usually associated to autosomal dominant early-onset AD. Pathogenic mutations have been found in three different genes: Presenilin 1 (*PSEN1*), Amyloid- β protein precursor (*A β PP*), and Presenilin 2 (*PSEN2*) (AD&FTD Mutation Database; <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>). Furthermore, some patients carrying a *GRN* mutation have been clinically diagnosed with AD, showing that in some cases, *GRN* mutations may mimic a clinical AD phenotype [9–11].

GRN gene is expressed in a wide variety of tissues, including neuronal and microglial populations of the central nervous system and codes for a precursor protein containing 7.5 tandem repeats of 12 cysteinyl granulin motifs. Mutations in *GRN* are responsible for FTLD with ubiquitin-positive, TAR DNA-binding protein (TARDBP, also known as TDP-43)-positive inclusions (FTLD-TDP43) [12]. However, clinical phenotypes are more heterogeneous. Currently, there are 69 different mutations described in the *GRN* gene (including point mutations, frameshift mutations and partial or complete gene deletions) (AD&FTD Mutation Database) that have been described mainly in familial or sporadic bvFTLD, although other clinical phenotypes such as PNFA, corticobasal syndrome, AD or even Parkinson's disease (PD) are also possible [11, 13–16]. These data, together with its incomplete penetrance at 65 years, suggest that *GRN* mutational screening should be considered in all FTLD patients (regardless of family history of dementia or age of onset) and even extend it to other clinical phenotypes. As pathogenic *GRN* mutations cause disease through haploinsufficiency, reduced serum or plasma levels of

progranulin protein (PGRN) have been proposed as a promising biomarker and as a screening method for the detection of *GRN* mutations, with a good sensitivity and specificity [9, 10, 17–20].

In this context, our main objective was to study if low serum PGRN levels may detect *GRN* mutations in a Spanish cohort of patients with FTLD or AD. Furthermore, we also wanted to know if mutations in the *PSEN1* gene could also be modifiers of serum PGRN levels, by analyzing them in presymptomatic and symptomatic *PSEN1* mutation carriers.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

We selected controls and patients diagnosed with FTLD or AD from the “Alzheimer's disease and other cognitive disorders” unit at the Hospital Clínic of Barcelona. All participants underwent a complete clinical and neuropsychological assessment and structural neuroimaging: cranial tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI). Functional imaging using either single photon emission tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET) was also performed in some patients. Furthermore, some patients underwent lumbar puncture in order to analyze cerebrospinal fluid (CSF) AD biomarkers. The diagnoses of the three clinical syndromes associated with FTLD (bvFTLD, PNFA, and SD) were made using the Neary's criteria [1] and diagnosis of AD using the NINCDS/ADRDA's criteria [21]. A total of 112 subjects were analyzed: 17 with bvFTLD, 20 with PNFA, 4 with SD, 34 with sporadic AD, 9 with symptomatic (AD-*PSEN1*), and 10 with presymptomatic *PSEN1* mutation carriers (presymp-*PSEN1*) and 18 control individuals. Their demographic data are summarized in Table 1. *PSEN1* mutations were: I439S, K239N, L282R, M139T (presymp-*PSEN1*) and I439S, K239N, L282R, M139T, L235R, L286P (AD-*PSEN1*). Furthermore, 5 family members were included after the detection of *GRN* mutations in the probands. Post-mortem confirmation of diagnosis is not available at this time for any of the subjects studied. All participants or their legal representatives gave their informed written consent, which was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona.

Determination of PGRN serum levels

Blood was drawn and processed within 4 h after collection. Each tube was centrifuged at 2000 \times g at 4°C

Table 1

Demographic characteristics of subjects included in the study. Two individual subjects (one with a missense *GRN* gene mutation and another one with a *PRNP* gene mutation have been detailed in the main text)

	bvFTLD	PNFA	SD	GRN Mutations*	AD	AD-PSEN1	Presympt-PSEN1	Controls
<i>n</i>	15	18	4	3	33	9	10	18
Age ^a (years)	63.0 (11.1)	71.0 (7.5)	76.7 (4.8)	64.0 (8.5)	67.3 (8.7)	53.0 (12.2)	36.3 (10.5)	55.1 (14.9)
Women (%)	60	66.7	25	100	66.7	25	80	67
Serum PGRN (ng/mL)	143.0 (25.5)	142.9 (30.0)	144.7 (26.1)	50.5 (21.2)	139.6 (23.8)	157.6 (48.4)	161.3 (31.9)	145.5 (28.5)
Range (ng/mL)	102.2–185.9	104.1–222.2	119.4–175.4	45.2–53.3	103.2–189.4	110.9–262.5	116.6–231.3	103.8–187.3
<i>p</i> value	NS	NS	NS	<0.001	NS	NS	NS	
<i>n</i> CSF	3	10	2	3	12	2	2	15
CSF A β ₁₋₄₂ levels (pg/mL)	501.1 (71.7)	635.2 (162.1)	594.6 (295.1)	640.9 (193.0)	315.9 (104.0)	367.5 (237.4)	1355.1 (373.8)	756.9 (91.0)
CSF t-tau levels (pg/mL)	437.9 (462.4)	297.5 (137.2)	207.4 (44.5)	231.0 (39.5)	905.8 (412.0)	1375.0 (106.1)	226.8 (8.8)	224.3 (70.7)
CSF p-tau levels (pg/mL)	59.1 (57.4)	54.6 (18.7)	37.8 (0.1)	38.2 (3.4)	134.1 (45.7)	159.6 (17.8)	52.6 (3.3)	48.7 (9.4)

Age, serum PGRN levels, CSF A β ₁₋₄₂ levels, CSF t-tau levels and CSF p-tau levels are shown as: mean (SD). *Null *GRN* mutations p.C366fsX1 and p.V279GfsX5. ^aAt blood sampling. *p* value represents the ANOVA comparisons between groups with a Dunnett's test *post hoc* correction for multiples comparisons, using the control groups as a reference; NS: no significant. PGRN: progranulin; bvFTLD: behavioral variant of frontotemporal lobar dementia; PNFA: progressive nonfluent aphasia; SD: semantic dementia; AD: Alzheimer's disease; AD-PSEN1: Alzheimer's disease patients with a mutation in *PSEN1* gene; Presympt-PSEN1: presymptomatic carriers of a mutation in *PSEN1* gene; t-tau: total tau; p-tau: phosphorylated tau at threonine 181.

for 10 min, and serum was separated and stored in 1 mL aliquots at -80°C until further use in this study. A commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to assess the PGRN level in each sample against a polyclonal antibody specific for human PGRN (Adipogen, Korea). Each sample was run in duplicate and absorbance readings at 450 nm were corrected for blank absorbance. Protein concentrations were extracted from a standard curve (quadratic polynomial). A positive serum control (*GRN* mutation carrier) was added in each assay to guide the interpretation of the results.

Genetic analysis

All the patients with serum PGRN levels below 120 ng/mL were screened for the presence of *GRN* mutations at the DNA level. We chose this cutoff over the higher serum cutoff of 94 ng/mL that had been previously published and had showed an excellent sensitivity and specificity for the detection of null mutations [18], with the objective of not considering cutoffs from other laboratories too rigorous.

The isolation of genomic DNA from blood was carried out using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). The exonic regions and flanking intronic sequences of *GRN* (exons 1-13) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using the Expand High-Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Germany) and primers that had been previously described [4]. The EXOAP purification was made before sequencing using the Big Dye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems,

Carlsbad, California). Moreover, patient 5 underwent a more complete mutational screening of exons and flanking intronic sequences of the following genes as previously described: *PSEN1* and *PSEN2* genes (exons 3-12) [22], A β PP gene (exons 16-17) [23], and *MAPT* gene (exons 1 and 9-13) [24]. Moreover, patient 5 also was screened for the presence of a mutation in *PRNP* gene. *PRNP* open reading frame was amplified by PCR [25]. The electrophoresed PCR product of the proband presented a double band: one lower band corresponding to the normal size and an upper band with a size of about 100–150 bp larger. The PCR product was cloned using the TA cloning system (Invitrogen, Paisley, UK). The sequence of those clones containing the larger band revealed the presence of a 120 nucleotides insertion, corresponding to a 5-OPRI within the repeat region of the prion protein (PrP) which results in an extended PrP. The sequence of this region that begins at residue 51 was R1, R2, R2, R3g, R2, R2, R2, R3g, R3g, R4.

A Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA) panel with specific oligonucleotide probes for *GRN* and *MAPT* genes and flanking regions (MLPA kit P275-MAPT) was used according to the manufacturers' instructions (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) in order to rule out the presence of a partial or whole gene deletion.

To demonstrate if the mutational mechanism was Non-sense Mediated mRNA Decay (NMD) or not, RNA was extracted from whole blood drawn in Tempus Blood RNA tubes (Applied Biosystems) and extracted with the Tempus Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems). Retrotranscription was performed with

Table 2
Serum progranulin levels and characteristics of subjects carrying a GRN mutation

Patient No	Mutation	Serum PGRN (ng/mL)	Initial clinical diagnosis	Age ^a
Null GRN mutations				
Patient 1	p.V279GfsX5	53.1	bvFTLD	74
Patient 1's sibling	p.V279GfsX5	74.4	PD	72
Patient 2	p.C366fsX1	45.2	AD	61
Patient 3	p.C366fsX1	53.3	PNFA	58
Pathogenic nature unclear ^b				
Patient 4	p.C139R	92.3	PNFA	67
Patient 4's sibling	p.C139R	95.4	Asymptomatic	66
Patient 4's descendent	p.C139R	89.3	Asymptomatic	42

^aAt blood sampling. ^bPredicted pathogenic missense mutation based on the absence in control individuals and on in silico data (evolutionary conservation and effect on protein structure and stability). PGRN: Progranulin; PNFA: Progressive nonfluent aphasia; AD: Alzheimer's disease; bvFTLD: behavioral variant of frontotemporal lobar dementia; PD: Parkinson's disease.

the SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Invitrogen).

Determination of CSF biomarkers

49 subjects underwent a lumbar puncture for the analysis of AD biomarkers in CSF: Amyloid- β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$), total tau (t-tau), and phosphorylated tau at threonine 181 (p-tau). These biomarkers were measured using ELISA (Innogenetics, Ghent, Belgium) as previously described [26]. We are participants of the QC program and $A\beta_{1-42}$, t-tau, and p-tau₁₈₁ levels obtained in our laboratory for the Alzheimer's Association QC samples were within a mean \pm 2 SD [27]. The following pathologic cutoffs values were used: $A\beta_{1-42}$ <500 pg/mL, t-tau >300 pg/mL in \leq 50 yo, >450 pg/mL in 51–70 yo, and >500 pg/mL in >70 yo, and p-tau₁₈₁ >75 pg/mL [26].

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the SPSS program, version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). We performed One-way ANOVA and a Dunnett's *post-hoc* test to compare the groups with the control group. The level of significance was defined as *p* value \leq 0.05.

RESULTS

Clinical and genetic data of patients with low serum PGRN levels

After the analysis of 112 subjects, we observed a wide range of serum PGRN levels (45.2–231.3 ng/mL). We detected 27 subjects with serum

PGRN levels below 120 ng/mL, although only 5 of them were below the previously described cutoff of 94 ng/mL [18]. We did not detect any GRN mutation in the patients with serum PGRN levels between 94 and 120 ng/mL. However, we detected two probable pathogenic mutations in the three cases (clinical diagnoses of bvFTLD, PNFA, and AD) with the lowest serum PGRN levels (mean = 50.5 ng/mL; SD = 21.2) and one mutation of unclear pathogenicity in a patient with PNFA and serum PGRN levels of 92.3 ng/mL (Table 2). Thus, probable pathogenic GRN mutation carriers showed significantly reduced serum PGRN levels to about one third of the mean levels observed in control individuals (mean = 145.5 ng/mL; SD = 28.5; *p* < 0.001) or other clinical groups (Table 1). The other patient with low PGRN levels (76.9 ng/mL) had a clinical diagnosis of bvFTLD and we detected a 5-octapeptide repeat insertion (5-OPRI) in the prion protein gene (*PRNP*). Further clinical and genetic data of these patients and the other studied family members are described in detail below.

Patient 1: GRN mutation p.V279GfsX5 carrier

This 69-year-old left-handed housewife consulted for a two-year history of behavioral disturbances. Her family reported depressive symptoms for the past 8 years, which were treated with antidepressants and, in the last two, insidious behavioral problems. She got divorced and, as noted, progressively abandoned personal hygiene. Delusional thoughts were present (“the maid steals”, prejudicial ideas against her ex-husband) although she did not exhibit disinhibition or antisocial conduct at this time. At the time of the first evaluation, she scored normal in all cognitive domains and a CT scan evidenced symmetric

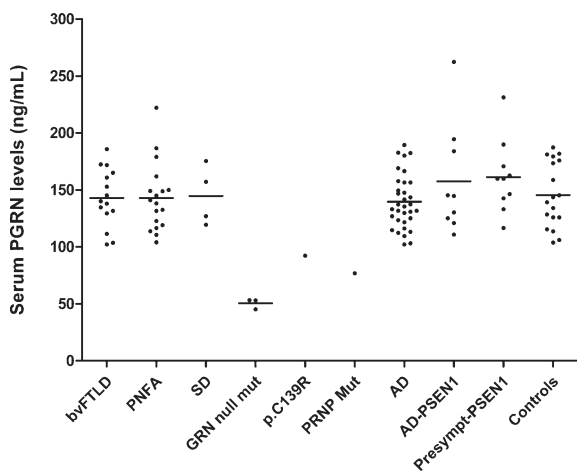


Fig. 1. Serum progranulin levels in the different groups with the mean values of the different groups represented as a line and individual subjects represented by dots. PGRN: progranulin; bvFTLD: behavioral variant of frontotemporal lobar dementia; PNFA: progressive nonfluent aphasia; SD: semantic dementia; AD: Alzheimer's disease; AD-PSEN1: Alzheimer's disease patients with a mutation in *PSEN1* gene; Presympt-PSEN1: Presymptomatic carriers of a mutation in *PSEN1* gene.

frontotemporal atrophy (Fig. 2A). The following year, her behavioral symptoms worsened with more apathy, lack of insight, compulsive eating, and memory problems, although marked cognitive and behavioral fluctuations were noted. A mild axial parkinsonism was detected with no response to risperidone withdrawal. The neuropsychological follow-up found marked worsening of executive tasks and memory. A perfusion SPECT showed a slightly asymmetric left-sided fronto-temporal perfusion deficit (Fig. 2B). She was diagnosed with bvFTLD although the diagnostic of Lewy body dementia was not completely ruled out. Over the next 18 months she exhibited a marked global worsening with clinically relevant axial parkinsonism, with a progressive gait disturbance without alterations in ocular movements, with grasping, disinhibition, violent behavior toward caregivers, lack of empathy, and progressive language impairment until she became completely mute (except for an occasional echolalia). Lumbar puncture was not performed. Her APOE genotype was $\epsilon 3/\epsilon 3$. Her father died at 71 with a non-specified dementia and a younger sibling was diagnosed at 65 with PD (Hoehn and Yahr stage of 2 on the last visit) but maintains cognitively intact 7 years after the appearance of first motor symptoms.

Proband's serum PGRN levels were 53.1 ng/mL. *GRN* gene sequencing demonstrated the presence of a new mutation that consisted in a single nucleotide substitution in the intron 8 splice acceptor site: Val279fs

IVS8-1 G>T. This mutation would probably lead to exon 9 skipping and a premature translation termination: p.V279GfsX5 (c.836_933del) mutation. At the genomic DNA level, we did not detect any single nucleotide polymorphism in her *GRN* coding region. Furthermore, we sequenced her cDNA and we only observed a single sequence corresponding to the normal allele. Her sibling carried the same mutation (serum PGRN levels of 74.4 ng/mL) and her offspring was not a carrier of the mutation (serum PGRN levels of 128.4 ng/mL).

Patient 2: *GRN* mutation p.C366fsX1 carrier

This 59-year-old right-handed woman complained about growing difficulty on tasks requiring number manipulations, spatial disorientation, and mild memory loss. Four months later, she also had word-finding problems with anomia and impaired comprehension. Her family did not report hallucinations or behavioral symptoms. There was no relevant previous medical history and there were no signs of parkinsonism or motor neuron disease in her neurological examination. The neuropsychological examination evidenced episodic and visual memory impairment, cognitive inflexibility, inattention, constructive apraxia, and initial language and visual-spatial deficits. She scored 25 out of 30 on the Mini-Mental State Examination (MMSE). A clinical diagnosis of AD was established. Brain MRI showed frontal atrophy and brain SPECT severe asymmetric left-sided predominant fronto-temporal-parietal hypoperfusion (Fig. 2C, D). Her APOE genotype was $\epsilon 2/\epsilon 3$. The CSF AD biomarkers were not suggestive of AD ($A\beta_{1-42}$ of 647 pg/mL, t-tau of 211 pg/mL, and p-tau of 35 pg/mL). It is worth noting that she was the only patient clinically diagnosed with AD that did not present the typical profile found in AD patients for these CSF biomarkers.

Her mother had suffered from cognitive impairment in her early sixties with relevant language disturbances and was diagnosed with AD. She died at 75 years of age in a stage of advanced dementia. Her maternal grandfather also suffered cognitive impairment in his sixties, but there was no clinical information available. None of her six younger siblings reported any cognitive complaints.

Serum PGRN levels were 45.2 ng/mL and *GRN* sequencing demonstrated the presence a dinucleotide deletion in the coding region of exon 10 (c.1095_1096delCT), causing a premature translation termination at the protein level (p.C366fsX1 mutation). cDNA from the proband was sequenced and we

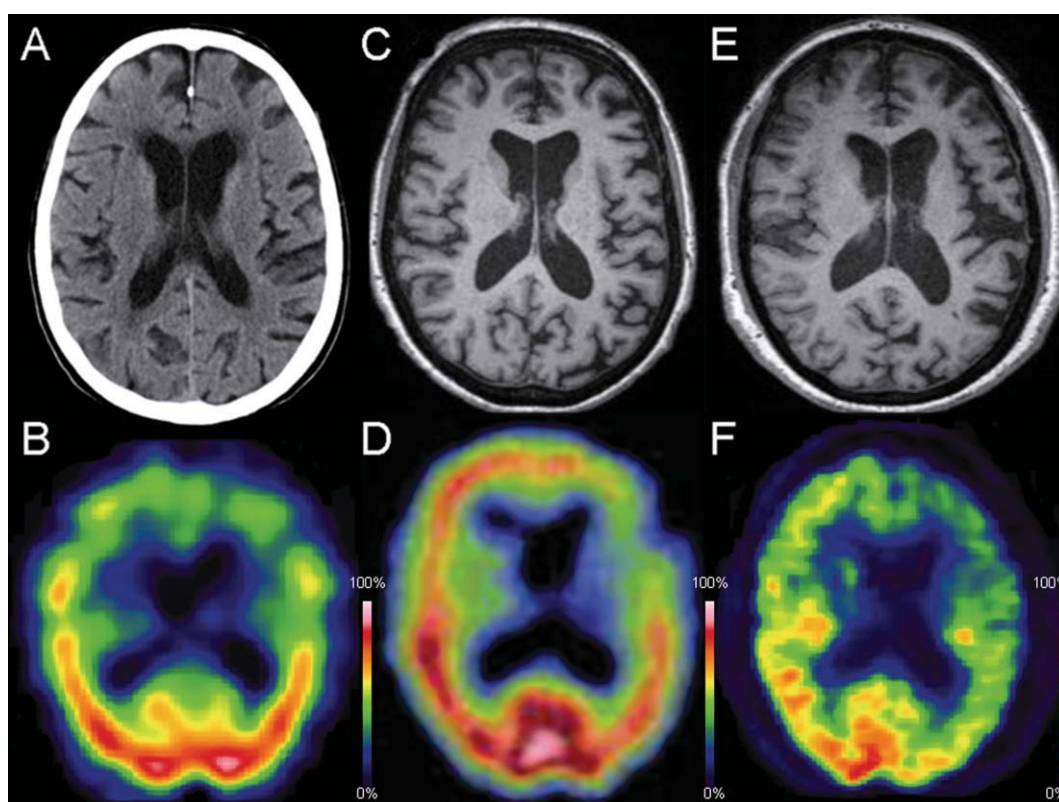


Fig. 2. Representative axial CT scans or T1-weighted MRI images of the patients 1, 2, and 3 (A, C, and E, respectively) and their corresponding functional brain neuroimaging (B, D, and F). Patient 1 had a symmetric frontotemporal atrophy in the CT scan (A) and an asymmetric left-sided frontotemporal perfusion defect in the SPECT (B). Patient 2's MRI scan showed mild frontal atrophy (C) and significant asymmetric left-sided frontotemporoparietal hypoperfusion in the SPECT (D). Frontal atrophy, but a predominantly left insular atrophy was evident in patient 3's MRI scan (E), as well as hypometabolism in the left superior frontal region in the PET (F).

observed a single sequence that corresponded to the normal allele.

Patient 3: GRN Mutation p.C366fsX1 carrier

This 57-year-old right-handed woman started with progressive word-finding difficulties six months before she visited our hospital. She simplified her language production, made frequent phonemic paraphasias and initiated conversations less frequently because she was afraid of making mistakes. She also became a little apathetic and had less initiative. Comprehension was preserved and she did not complain of other cognitive or behavioral symptoms. In her neurological examination there was no parkinsonisms or speech apraxia, and repetition of sentences was preserved. Slow speech rate with occasional prolonged intervals between words and grammatical errors were present in her spontaneous speech. An initial clinical diagnosis of PNFA was made. The neuropsychological evaluation revealed reduced verbal fluency, difficulties in

face recognition in the Rivermead test, inability to inhibit automatic series in the Stroop test, and episodic memory impairment, although she scored 30 out of 30 on the MMSE. Bilateral frontal atrophy, predominantly in the left insular region, was relevant in the brain MRI (Fig. 2E), and hypometabolism in the left superior frontal region was evident in the brain PET scan (Fig. 2F). She had normal CSF AD biomarkers ($A\beta_{1-42}$ of 946 pg/mL, t-tau of 276 pg/mL, and p-tau of 42 pg/mL). Her APOE status was $\epsilon 3/\epsilon 3$. Her mother was diagnosed with AD at the age of 68 and died in her eighties. There were no other family members with cognitive impairment.

Serum PGRN levels were 53.3 ng/mL and *GRN* sequencing demonstrated the presence of the p.C366fsX1 (c.1095_1096delCT) mutation.

Patient 4: GRN mutation p.C139R carrier

This right-handed man started at the age of 60 years with a progressive language disturbance that consisted

in reduced speech output. He had no family history of neurological disease. At the moment of the first neurological examination (at 65), he presented with a low fluency in spontaneous speech, with agrammatical features and decreased articulatory accuracy. The physical examination revealed discrete signs of axial parkinsonism. The neuropsychological testing showed a MMSE score of 27 out of 30, no naming deficits, normal comprehension, and speech apraxia. Episodic memory and semantic memory were preserved, as were the other cognitive domains. The MRI examination revealed a moderate global cortical atrophy without significant vascular lesions. The AD CSF biomarkers profile showed a mildly reduced $A\beta_{1-42}$ (445 pg/mL) with a normal t-tau (205 pg/mL) and a normal p-tau (38 pg/mL). His APOE status was $\epsilon 3/\epsilon 3$. He was diagnosed with PNFA. During the following 2 years, he presented with relentless motor impairment, progressive gait disturbance with repetitive falls and relatively stable language impairment. His physical examination revealed hypomimia, altered vertical ocular movements (not present at the first visit), speech apraxia, and unmotivated laugh. Marked axial rigidity was present with global bradykinesia and constructive apraxia. A diagnosis of atypical progressive supranuclear paralysis (PSP) was established. A screening of serum PGRN levels was carried-out with a result of 92.3 ng/mL. The *GRN* sequencing demonstrated the presence of the p.C139R (c.415T>C) mutation. It is a point mutation in the coding region predicting an amino acid substitution from Cysteine to Arginine. We sequenced the cDNA and we observed the presence of the two alleles.

Two additional family members, asymptomatic mutation carriers, present with serum PGRN levels similar to the patient's (95.4 and 89.3 ng/mL). The neuropsychological evaluation of proband's sibling was completely normal at 66 years of age. The serum PGRN levels of another non-carrier family member were normal (143 ng/mL).

Patient 5: PRNP mutation 5-OPRI carrier

A 42-year-old man consulted for slow progressive behavioral disturbances and progressive cognitive impairment. The clinical symptoms started at 35 years of age when he lost initiative and was less participative in daily family activities. As time went by, he became progressively joyless and scatterbrained and experienced memory alterations, driving problems, and word-finding difficulties. He was diagnosed with bvFTLD. At the time of his first visit to our hospital

(at 42 years of age), he was anosognosic. The neurological examination showed no parkinsonism, gaze palsy, myoclonus, or signs of motor neuron disease. The MRI revealed global cortical atrophy. No lumbar puncture was performed. Serum PGRN levels were of 76.9 ng/mL.

His father had similar initial symptoms at 47 years of age and they progressed to a PSP-like clinical presentation. He died at 59 years of age in a state of advanced dementia. Two out of three of his father's sisters and their father also presented with behavioral and cognitive decline in their seventies. The patient's 47-year-old sibling initiated a similar clinical picture at 42 yo. Her serum PGRN levels were of 75.2 ng/mL.

Screening mutation for *PGRN*, *MAPT*, *PSEN1*, *PSEN2*, and *A\beta PP* genes was negative. MLPA with probes for genes *GRN* and *MAPT* did not show any copy-number alteration of these regions. A 5-OPRI mutation in *PRNP* was detected in the patient and his sibling. Both of them had methionine homozygosity at the polymorphic codon 129 of the *PRNP* gene.

Serum progranulin levels in FTL D, AD, and controls

After excluding the 5 patients who carried *GRN* or *PRNP* mutations, we found no significant differences between controls and the other neurodegenerative groups (Table 1). In spite of the limited number of subjects, there were no differences between the different subtypes of FTL D: bvFTLD (mean = 143.0 ng/mL; SD = 25.5), PNFA (mean = 142.9 ng/mL; SD = 30.0), and SD (mean = 144.7 ng/mL; SD = 26.1) (Fig. 1).

Serum progranulin levels in AD PSEN1 mutation carriers

There were no differences between *PSEN1* mutation carriers and controls or with other neurodegenerative diseases groups. We did not detect differences between presymptomatic (mean = 161.3 ng/mL; SD = 31.9) and symptomatic (mean = 157.6 ng/mL; SD = 48.4) *PSEN1* mutation carriers either (Fig. 1).

CSF biomarkers

CSF was available in 34 patients (3 *GRN* mutations, 3 bvFTLD, 10 PNFA, 2 SD, 12 AD, 2 AD-PSEN1, and 2 presympt-PSEN1) and in 15 controls (Table 1).

All clinical AD patients, except patient 2, showed a CSF biomarker profile that was characteristic of AD, with reduced levels of $A\beta_{1-42}$ and elevated levels of

t-tau and/or p-tau. None of FTLD patients had this CSF biomarker profile, although two patients with bvFTLD and two PNFA presented with reduced levels of A β ₁₋₄₂ (with normal tau) and one patient with bvFTLD and one with PNFA had elevated levels of t-tau and/or p-tau (with normal A β ₁₋₄₂ levels).

DISCUSSION

In this study, we screened serum PGRN levels in a Spanish cohort of FTLD patients, AD patients, and controls. We detected no differences in serum PGRN levels between controls and the following clinical syndromes: bvFTLD, PNFA, SD, and AD patients. These results are in agreement with the vast majority of previous studies [10, 17–19], although we did not find an increase in PGRN levels in PNFA patients compared to controls, as has been reported recently [19]. As expected, we did not find differences in serum PGRN levels between *PSEN1* mutation carriers and the other groups.

We noted that five patients had serum PGRN levels below 94 ng/mL [18]. Four of them were carriers of *GRN* mutations (three patients carried a null mutation and one patient the missense p.C139R mutation) whereas the other patient was a carrier of one 5-OPRI mutation in *PRNP*. Serum PGRN levels of null *GRN* mutation carriers were reduced to 1/3 with respect to controls, which corresponds well with the complete loss of activity of one of the two *GRN* alleles (leading to PGRN haploinsufficiency) [4, 5]. We were also able to analyze PGRN serum levels in two asymptomatic carriers of the p.C139R mutation, and we found similar levels compared to the proband.

In previous studies, the range of serum or plasma PGRN levels observed in null mutation carriers did not overlap with that of non-carriers, predicting an excellent diagnostic performance [10, 17–19], and different laboratories have tried to define the optimal threshold for serum or plasma PGRN levels below which the presence of a pathogenic *GRN* mutation should be considered. In this sense, the more recently proposed cutoffs are lower than the initial ones: 67 ng/mL [19] and 61.5 ng/mL [28]. We cannot define neither a cutoff nor sensitivity and specificity in our cohort because we have only sequenced those patients with serum PGRN levels below 120 ng/mL and we cannot formally rule out that individuals with higher serum PGRN levels might carry a *GRN* mutation. Anyway, the application in our cohort of these lowest thresholds, compared with the highest ones (94 ng/mL), would

increase specificity but lower sensitivity. For example, we would not have included the *PRNP* mutation for screening (76.9 ng/mL) but we would have missed a null mutation carrier (Patient 1's sibling), and the missense mutation with unclear pathogenicity.

In our cohort, we detected a new *GRN* gene mutation and two previously reported *GRN* mutations, adding new information about their phenotype. The Val279fs IVS8-1 G>T mutation had not been described previously. However, there are two patients reported who carried the Val279fs IVS8-1 G>C mutation, described as clearly pathogenic [4, 13]. At the protein level, this mutation is predicted to cause exon 9 skipping, frameshift and premature translation termination [4, 13]. Moreover, it is likely to create null alleles through the NMD mechanism, as demonstrated for the mutation located in the same nucleotide (Val279fs IVS8-1 G>C) [15], and we demonstrated a lack of expression of the mutant allele in the analysis of the cDNA sequence of our proband. The two patients carrying the Val279fs IVS8-1 G>C mutation reported thus far had different clinical phenotypes and inheritance. One of them was clinically diagnosed with corticobasal syndrome and familial inheritance [13], while the other had a clinical diagnosis of sporadic bvFTLD [29]. Our patient was also diagnosed with bvFTLD with an age of onset of 67 years, and her father died at 71 with a non-specified dementia. Interestingly, her younger sibling was diagnosed with PD, with an age of onset at 65 years and persists without cognitive alteration 7 years later. Although moderate parkinsonism is frequent in some *GRN* mutations, this clinical diagnosis alone without behavioral or cognitive symptoms is not common. Only two subjects have been described having both PD and *GRN* mutations, one with neuropathological confirmation of both FTLD ubiquitin-positive inclusions and Lewy body pathologic features [11, 30]. Data from *GRN* sequencing screening of PD patients do not support a major role of *GRN* in the genetic etiology of PD [11, 31]. Nowadays, we cannot discern if this patient's clinical phenotype is related to the *GRN* mutation or to coincidental idiopathic PD. Clinical follow-up and neuropathological examinations will be necessary to elucidate this question.

We also detected the frameshift mutation p.C366fsX1 in two unrelated and independent patients, although we cannot rule out a common ancestor in these families. This mutation causes a frameshift and a premature translation termination, predicted to result in a NMD mechanism [16]. The only previously reported patient with the same *GRN* mutation was diagnosed as sporadic bvFTLD with an age of onset

of 74 years [16, 32]. Our two cases had an earlier age of onset with a positive family history, although their clinical diagnoses were different: PNFA and AD (but with relevant early language impairment). These three cases highlight the clinical variation in subjects with the same *GRN* mutation.

The other *GRN* mutation detected in our cohort was the previously described p.C139R mutation. The p.C139R mutation has been reported in four independent patients with different clinical phenotypes (two FTLD, one primary progressive aphasia, and one AD patient) and it is absent from 907 control individuals [10, 33–35]. We detected this mutation in a patient with PNFA that progressed to PSP-like phenotype, but her sibling is asymptomatic at 66 years of age. The proband and two asymptomatic carriers of this mutation showed a partial reduction in serum PGRN levels (92.3 ng/mL, 95.4 ng/mL, and 89.3 ng/mL respectively), lower than in controls but higher than in null mutation carriers, fitting the hypothesis of partial loss of function caused by this missense mutation [18]. The serum PGRN levels described previously in a patient and an asymptomatic carrier were very similar: 102.1 ng/mL and 94.4 g/mL, respectively [18]. There were two more patients with the same p.C139R and PGRN levels measured in plasma, with slightly higher levels (128.2 ng/mL and 124.2 ng/mL) [10, 35]. This difference could be explained by the use of a different biological sample (serum versus plasma) or simply because of the inherent ELISA technique variability. This less pronounced reduction of PGRN means that this mutation does not produce a complete loss of mutant protein, as happens in null mutations, but might act by increasing susceptibility to various forms of neurodegeneration. This hypothesis is compatible with the different clinical phenotypes associated to this mutation. However, the analysis of the cDNA sequence demonstrates the presence of the mutant allele in the same proportion than the wild-type allele in our proband. So, its pathogenic nature is unclear, although *in silico* predictions evidenced that p.C139R is most likely pathogenic, based on evolutionary conservation and protein modeling, by interfering with PGRN folding by destroying one of the Cys-bridges in the granulin domain F (Gran F), responsible for the typical folding of each of granulin domain of PGRN, known as the granulin Cys-fold [33].

To the best of our knowledge, serum PGRN levels have not been previously described in carriers of *PRNP* mutations. The identification of low serum PGRN levels in a patient with a *PRNP* mutation was an unexpected and interesting finding. PGRN expression is

increased in activated microglia in Creutzfeldt–Jakob disease [36] and other neurodegenerative diseases like *GRN* associated-FTLD [37]. This upregulation could be due to a response to neurodegeneration, as has been reported in severely affected brain regions (frontal cortex) of patients carrying a *GRN* mutation [37, 38]. Future studies will be necessary to elucidate if low serum PGRN levels are a common feature of genetic or sporadic CJD.

In conclusion, in spite of the limited number of subjects, our results support the use of serum PGRN levels as a biomarker for the detection of *GRN* mutations independently of the clinical phenotype. The screening of cohorts with different clinical phenotypes with easy, quick, and cost-effective tools will allow for the identification of new *GRN* mutations as well as increase our knowledge of their clinical expression.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the participants of this study for their cooperation. The authors are indebted to Teresa Botta-Orfila and Rosa M^a Álvarez for excellent technical assistance. This work was supported by grants to Dr Raquel Sánchez-Valle (FIS080036. ISCIII. Cofinancia FEDER. Unión Europea. Otra manera de hacer Europa), to Dr José Luis Molinuevo (CSD2010-00045), and to Dr Albert Lladó (PI11/00234. ISCIII. Cofinancia FEDER. Unión Europea. Otra manera de hacer Europa).

Authors' disclosures available online (<http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=1291>).

REFERENCES

- [1] Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J, Benson DF (1998) Frontotemporal lobar degeneration: A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* **51**, 1546-1554.
- [2] Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, de Koning I, Pijnenburg Y, de Jong D, Dooijes D, Kamphorst W, Ravid R, Niermeijer MF, Verheij F, Kremer HP, Scheltens P, van Duijn CM, Heutink P, van Swieten JC (2003) Frontotemporal dementia in The Netherlands: Patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain* **126**, 2016-2022.
- [3] Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lanfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate

- A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702-705.
- [4] Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, 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.
- [5] Cruts M, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C (2006) Progranulin mutations in ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Curr Alzheimer Res* **3**, 485-491.
- [6] Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Rytten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Holtta-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chio A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, The ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogava E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pank SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257-268.
- [7] DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245-256.
- [8] Alzheimer's Association (2009) 2009 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **5**, 234-270.
- [9] Carecchio M, Fenoglio C, De Riz M, Guidi I, Comi C, Cortini F, Venturelli E, Restelli I, Cantoni C, Bresolin N, Monaco F, Scarpini E, Galimberti D (2009) Progranulin plasma levels as potential biomarker for the identification of GRN deletion carriers. A case with atypical onset as clinical amnesic mild cognitive impairment converted to Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **287**, 291-293.
- [10] Finch N, Baker M, Crook R, Swanson K, Kuntz K, Surtees R, Bisceglia G, Rovelet-Lecrux A, Boeve B, Petersen RC, Dickson DW, Younkin SG, Deramecourt V, Crook J, Graff-Radford NR, Rademakers R (2009) Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain* **132**, 583-591.
- [11] Brouwers N, Nuytemans K, van der Zee J, Gijssels I, Engelborghs S, Theuns J, Kumar-Singh S, Pickut BA, Pals P, Dermaut B, Bogaerts V, De Pooter T, Serneels S, Van den Broeck M, Cuijt I, Mattheijssens M, Peeters K, Sciot R, Martin JJ, Cras P, Santens P, Vandenberghe R, De Deyn PP, Cruts M, Van Broeckhoven C, Sleegers K (2007) Alzheimer and Parkinson diagnoses in progranulin null mutation carriers in an extended founder family. *Arch Neurol* **64**, 1436-1446.
- [12] Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM (2010) Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: An update. *Acta Neuropathol* **119**, 1-4.
- [13] Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, Crook R, Melquist S, Kuntz K, Petersen R, Josephs K, Pickering-Brown SM, Graff-Radford N, Uitti R, Dickson D, Wszolek Z, Gonzalez J, Beach TG, Bigio E, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, White CL 3rd, Woodruff B, Caselli R, Hsiung GY, Feldman H, Knopman D, Hutton M, Rademakers R (2006) Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet* **15**, 2988-3001.
- [14] Snowden JS, Pickering-Brown SM, Mackenzie IR, Richardson AM, Varma A, Neary D, Mann DM (2006) Progranulin gene mutations associated with frontotemporal dementia and progressive non-fluent aphasia. *Brain* **129**, 3091-3102.
- [15] Masellis M, Momeni P, Meschino W, Heffner R Jr, Elder J, Sato C, Liang Y, St George-Hyslop P, Hardy J, Bilbao J, Black S, Rogava E (2006) Novel splicing mutation in the progranulin gene causing familial corticobasal syndrome. *Brain* **129**, 3115-3123.
- [16] Le Ber I, van der Zee J, Hannequin D, Gijssels I, Campion D, Puel M, Laquerriere A, De Pooter T, Camuzat A, Van den Broeck M, Dubois B, Sellal F, Lacomblez L, Vercelletto M, Thomas-Anterion C, Michel BF, Golfier V, Didic M, Salachas F, Duyckaerts C, Cruts M, Verpillat P, Van Broeckhoven C, Brice A, French Research Network on FTD/FTD-MND (2007) Progranulin null mutations in both sporadic and familial frontotemporal dementia. *Hum Mutat* **28**, 846-855.
- [17] 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.
- [18] Sleegers K, Brouwers N, Van Damme P, Engelborghs S, Gijssels I, van der Zee J, Peeters K, Mattheijssens M, Cruts M, Vandenberghe R, De Deyn PP, Robberecht W, Van Broeckhoven C (2009) Serum biomarker for progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol* **65**, 603-609.
- [19] Schofield EC, Halliday GM, Kwok J, Loy C, Double KL, Hodges JR (2010) Low serum progranulin predicts the presence of mutations: A prospective study. *J Alzheimers Dis* **22**, 981-984.
- [20] Rossi G, Piccoli E, Benussi L, Caso F, Redaelli V, Magnani G, Binetti G, Ghidoni R, Perani D, Giaccone G, Tagliavini F (2011) A novel progranulin mutation causing frontotemporal lobar degeneration with heterogeneous phenotypic expression. *J Alzheimers Dis* **23**, 7-12.
- [21] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263-269.
- [22] Cruts M, van Duijn CM, Backhovens H, Van den Broeck M, Wehnert A, Serneels S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, St George-Hyslop PH, Hofman A, Van Broeckhoven C (1998)

- Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* **7**, 43-51.
- [23] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706.
- [24] Rizzu P, Van Swieten JC, Joosse M, Hasegawa M, Stevens M, Tibben A, Niermeijer MF, Hillebrand M, Ravid R, Oostra BA, Goedert M, van Duijn CM, Heutink P (1999) High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *Am J Hum Genet* **64**, 414-421.
- [25] Sanchez-Valle R, Nos C, Yague J, Graus F, Dominguez A, Saiz A, Catalan Collaborative Study Group for CJD (2004) Clinical and genetic features of human prion diseases in Catalonia: 1993-2002. *Eur J Neurol* **11**, 649-655.
- [26] Antonell A, Fortea J, Rami L, Bosch B, Balasa M, Sanchez-Valle R, Iranzo A, Molinuevo JL, Llado A (2010) Different profiles of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers in controls and subjects with subjective memory complaints. *J Neural Transm* **118**, 259-262.
- [27] Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H (2010) Inter-laboratory variation in cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: United we stand, divided we fall. *Clin Chem Lab Med* **48**, 603-607.
- [28] Ghidoni R, Stoppani E, Rossi G, Piccoli E, Albertini V, Paterlini A, Glionna M, Pegoiani E, Agnati LF, Fenoglio C, Scarpini E, Galimberti D, Morbin M, Tagliavini F, Binetti G, Benussi L (2012) Optimal plasma progranulin cutoff value for predicting null progranulin mutations in neurodegenerative diseases: A multicenter Italian study. *Neurodegener Dis* **9**, 121-127.
- [29] Coppola G, Karydas A, Rademakers R, Wang Q, Baker M, Hutton M, Miller BL, Geschwind DH (2008) Gene expression study on peripheral blood identifies progranulin mutations. *Ann Neurol* **64**, 92-96.
- [30] Rovelet-Lecrux A, Deramecourt V, Legallic S, Maurage CA, Le Ber I, Brice A, Lambert JC, Frebourg T, Hannequin D, Pasquier F, Campion D (2008) Deletion of the progranulin gene in patients with frontotemporal lobar degeneration or Parkinson disease. *Neurobiol Dis* **31**, 41-45.
- [31] Nuytemans K, Pals P, Sleegers K, Engelborghs S, Corsmit E, Peeters K, Pickut B, Mattheijssens M, Cras P, De Deyn PP, Theuns J, Van Broeckhoven C (2008) Progranulin variability has no major role in Parkinson disease genetic etiology. *Neurology* **71**, 1147-1151.
- [32] Le Ber I, Camuzat A, Hannequin D, Pasquier F, Guedj E, Rovelet-Lecrux A, Hahn-Barma V, van der Zee J, Clot F, Bakchine S, Puel M, Ghanim M, Lacomblez L, Mikol J, Deramecourt V, Lejeune P, de la Sayette V, Belliard S, Vercelletto M, Meyrignac C, Van Broeckhoven C, Lambert JC, Verpillat P, Campion D, Habert MO, Dubois B, Brice A, French research network on FTD/FTD-MND (2008) Phenotype variability in progranulin mutation carriers: A clinical, neuropsychological, imaging and genetic study. *Brain* **131**, 732-746.
- [33] Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S, Maurer-Stroh S, Gijssels I, van der Zee J, Pickut BA, Van den Broeck M, Mattheijssens M, Peeters K, Schymkowitz J, Rousseau F, Martin JJ, Cruts M, De Deyn PP, Van Broeckhoven C (2008) Genetic variability in progranulin contributes to risk for clinically diagnosed Alzheimer disease. *Neurology* **71**, 656-664.
- [34] Bernardi L, Tomaino C, Anfossi M, Gallo M, Geracitano S, Costanzo A, Colao R, Puccio G, Frangipane F, Curcio SA, Mirabelli M, Smirne N, Iapaolo D, Maletta RG, Bruni AC (2009) Novel PSEN1 and PGRN mutations in early-onset familial frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* **30**, 1825-1833.
- [35] Bagnoli S, Piaceri I, Tedde A, Piacentini S, Nannucci S, Bracco L, Sorbi S, Nacmias B (2011) Progranulin genetic screening in frontotemporal lobar degeneration patients from central Italy. *Cell Mol Neurobiol* **32**, 13-16.
- [36] Baker CA, Manuelidis L (2003) Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 675-679.
- [37] Chen-Plotkin AS, Xiao J, Geser F, Martinez-Lage M, Grossman M, Unger T, Wood EM, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Lee VM (2010) Brain progranulin expression in GRN-associated frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* **119**, 111-122.
- [38] Ahmed Z, Mackenzie IR, Hutton ML, Dickson DW (2007) Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **4**, 7.

Trabajo número 3

Decreased striatal dopamine transporter uptake in progressive non-fluent aphasia.

Gil-Navarro S, Lomeña F, Cot A, Lladó A, Montagut N, Castellví M, Bosch B, Rami L, Antonell A, Balasa M, Pavia J, Iranzo A, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R.

European Journal of Neurology 2013. May 17 [Epub ahead of print]

IF 4.162 (JCR 2012); Q1 Clinical Neurology

Decreased striatal dopamine transporter uptake in the non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia

S. Gil-Navarro^a, F. Lomeña^b, A. Cot^{c,d}, A. Lladó^{a,e}, N. Montagut^a, M. Castelliv^a, B. Bosch^a, L. Rami^{a,e}, A. Antonell^{a,e}, M. Balasa^{a,e}, J. Pavia^{b,d}, A. Iranzo^{e,f}, J. L. Molinuevo^{a,e} and R. Sánchez-Valle^{a,e}

^aAlzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Department, Hospital Clínic, Barcelona; ^bNuclear Medicine Department, Hospital Clínic, Barcelona; ^cBiophysics and Bioengineering Unit, Universitat de Barcelona, Barcelona; ^dBiomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), CIBER de Bioingeniería, Barcelona; ^eInstitut d'Investigació Biomèdica August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona; and ^fNeurology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Keywords:

¹²³I-FP-CIT, Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, parkinsonian disorders, primary progressive aphasia, primary progressive non-fluent aphasia

Received 27 February 2013
Accepted 15 April 2013

Background and purpose: Patients with the non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia (nfvPPA) may develop atypical parkinsonian syndromes. However, there is no current biomarker to assess which patients are at high risk of developing parkinsonism. ¹²³I-2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropine (¹²³I-FP-CIT)-SPECT detects striatal dopamine dysfunction *in vivo*. The objective of the present study was to study whether non-fluent/agrammatic patients without parkinsonism at baseline present decreased striatal ¹²³I-FP-CIT uptake.

Methods: Visual and semi-quantitative assessments of the striatal ¹²³I-FP-CIT uptake ratio were carried out in 15 patients with nfvPPA, eight patients with the logopenic variant of PPA (lvPPA) and 18 controls. To rule out progranulin mutations or underlying Alzheimer's disease (AD), serum progranulin levels and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers of AD (Aβ₄₂, total-tau, phosphorylated-tau₁₈₁) were determined. A second ¹²³I-FP-CIT-SPECT analysis in the biomarker-enriched groups was also carried out.

Results: Patients with nfvPPA presented reduced striatal ¹²³I-FP-CIT binding, especially in the left hemisphere ($P = 0.002$), compared with controls. All lvPPA patients had normal striatal ¹²³I-FP-CIT uptake. ¹²³I-FP-CIT striatal binding in nfvPPA patients with normal progranulin and CSF biomarker levels (nfvPPA/bio-) was also significantly reduced ($P < 0.05$) compared with lvPPA patients with positive AD biomarkers. Sixty-four per cent (9/14) of nfvPPA patients and 80% of nfvPPA/bio- patients (8/10) showed a diminished individual left striatal ¹²³I-FP-CIT uptake ratio. On follow-up, seven nfvPPA/bio- patients developed parkinsonism (median 1.9 years; range 1.2–2.9), six of them with baseline reduced ¹²³I-FP-CIT uptake.

Conclusions: Reduced striatal tracer uptake in nfvPPA patients prior to clinical parkinsonism can be detected by ¹²³I-FP-CIT-SPECT, especially in those with nfvPPA/bio-, suggesting subclinical nigrostriatal degeneration. Decreased striatal ¹²³I-FP-CIT binding might identify PPA patients at increased risk of developing atypical parkinsonian syndromes, probably related to tau-pathology.

Introduction

The non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia (nfvPPA) or progressive non-fluent aphasia is a clinical entity characterized by a progres-

sive language disorder with predominant agrammatical language and/or effortful speech with speech sound errors and distortions attributable to apraxia of speech (AOS) [1]. Sentence comprehension deficits of complex syntactic structures are frequently present [2]. This condition is due to neurodegeneration, and as the disease progresses, other extra-linguistic domains are also affected. In addition, some non-fluent/agrammatic patients develop a motor disorder with atypical

Correspondence: R. Sánchez-Valle, Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders Unit, Neurology Department, Hospital Clínic de Barcelona, c/Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain (tel.: +34 932 275785; fax: +34 932 275783; e-mail: rsanchez@clinic.ub.es).

parkinsonian features, evolving towards a corticobasal syndrome (CBS), progressive supranuclear palsy (PSP) syndrome or a mixed syndrome [3,4].

Different clinicopathological series have confirmed the heterogeneity of the underlying pathology in nfvPPA. Considered as a whole, the majority of non-fluent/agrammatic patients have frontotemporal lobar degeneration with tau-positive inclusions (FTLD-tau), mainly four-repeat tauopathies, such as corticobasal degeneration (CBD) or PSP [3–5]. However, a significant proportion of cases, up to 30–40% of nfvPPA in some series, present Alzheimer's disease (AD) pathology at post-mortem [6,7]. Other series have also highlighted the presence of trans-activation-response (TAR) DNA binding protein 43 (TDP-43)-positive cellular inclusions (FTLD-TDP pathology) [8] and mutations in the progranulin gene (*GRN*) [9]. Discrepancies in the different neuropathological series of nfvPPA have been partially attributed to the lack of consensus on the diagnostic criteria of primary progressive aphasia (PPA) patients between different centres and the recent description of the logopenic variant of PPA (lvPPA) or logopenic progressive aphasia [10]. This variant, which is mainly associated with AD pathology [11], had previously been classified in some reports within the non-fluent/agrammatic group [12].

In order to improve and unify the current research criteria in PPA, an international panel of experts recently published a consensus classification for subtyping PPA into the three most frequent and accepted PPA variants. The classification defines each variant according to the presence or absence of core language features and makes recommendations to support clinical diagnosis with neuroimaging criteria and/or a definite pathological diagnosis [13]. As the authors point out, no absolute correlation exists between PPA clinical phenotypes and pathological findings. However, the authors suggest that incorporating biomarkers (biofluid, genetic and neuroimaging) into the diagnosis of PPA would be desirable to supplement clinical descriptions and future clinical-pathological correlations from different laboratories.

Biomarkers represent one of the major advances in neurodegenerative diseases, with the aim of predicting pathological changes *in vivo*. SPECT imaging using radiolabelled ^{123}I -2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropine (^{123}I -FP-CIT), which selectively binds to striatal pre-synaptic dopamine transporters, detects nigrostriatal dopaminergic degeneration in patients with different types of neurodegenerative parkinsonism, such as Parkinson's disease (PD) [14], dementia with Lewy bodies [15], multiple system atrophy [16], CBD [17] and PSP [18]. In addition, recent reports also indicate that ^{123}I -FP-CIT-SPECT

shows reduced striatal tracer uptake in patients at risk for the development of parkinsonism, such as patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder [19] and asymptomatic carriers of mutations in the Parkin gene (*PARK2*) and the PINK1 gene (*PARK6*) [20]. Thus, reduced ^{123}I -FP-CIT uptake might be considered a biomarker of subclinical nigrostriatal degeneration and/or a predictor of clinical parkinsonism in these subjects.

In this context, it was hypothesized that non-fluent/agrammatic patients at risk of developing clinical parkinsonism related to FTLD-tau pathology could already present decreased striatal ^{123}I -FP-CIT uptake, even in the absence of clinical parkinsonian features. This finding would not be expected in all PPA variants. On the contrary, patients with lvPPA, mainly related to AD pathology, who rarely present parkinsonism during follow-up [21] would be expected to show a normal ^{123}I -FP-CIT-SPECT. Thus, the aim of this study was to evaluate the nigrostriatal pathway using ^{123}I -FP-CIT-SPECT in non-fluent/agrammatic patients without clinical parkinsonism at baseline and to compare the results with a group of patients affected by another variant of PPA, the logopenic variant.

Methods

Participants and protocol approval

Twenty-three patients, of whom 15 fulfilled the criteria for nfvPPA and eight for lvPPA [13], were selected from 35 consecutive patients presenting with progressive language impairment at the Alzheimer and Other Cognitive Disorders Unit of the Hospital Clínic, Barcelona, Spain, from May 2009 to December 2011. We excluded 12 participants who: (i) met the criteria for semantic dementia or were unclassifiable; and (ii) presented parkinsonism in the neurological examination (score of > 1 in any item of part III of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale except on speech evaluation) and/or abnormal eye movements. Eighteen healthy control subjects adjusted for age were included for neuroimaging comparisons. All participants were native Spanish speakers and right-handed. The study was approved by the Hospital Clínic Ethics Committee and all participants gave written informed consent before entering the study.

At the time of the initial visit, language and speech deficits were the principal cause of functional impairment and all patients fulfilled current clinical diagnostic criteria for PPA [13–22]. All patients underwent a structured medical history, clinical and cognitive examination and brain MRI. The clinical evaluation included a general neurological examination, focused

on motor and ocular movement disturbances, and a semi-quantitative assessment of motor speech-language impairment using the Progressive Aphasia Language Scale (PALS) [23] adapted to Spanish-speaking patients. Each feature was scored as absent (0), subtle or questionable (1), mild but definitely present (2), or moderate or severe (3). All participants were clinically re-evaluated using a complete neurological examination performed by the same neurologist every 6 months after inclusion.

We performed a comprehensive cognitive evaluation that assessed episodic memory, language, visuospatial/perceptive skills, praxis and executive functioning. Language testing included several subtests from the Boston Diagnosis Aphasia Examination battery [24], the Boston Naming test [25], the Controlled Oral Word Association Test (COWAT 1 min, letters F, A, S) [26] and the Pyramid and Palm Trees test [27]. The normative range of scores for standardized tests were used.

As defined in the following section, patients were subsequently classified depending on their biomarker profile into nfvPPA patients with both normal serum progranulin levels and normal levels of cerebrospinal fluid (CSF) AD biomarkers (nfvPPA/bio-) and lvPPA patients with normal serum progranulin levels but a CSF biomarker profile suggestive of AD (lvPPA/bio-ADm).

Biochemical and genetic biomarkers

Blood sampling for *APOE* genotyping and serum progranulin levels was performed in all subjects. A commercial ELISA kit was used to assess the serum progranulin levels (AdipoGen Inc., Seoul, Korea). All patients with serum progranulin levels < 120 ng/ml were screened by direct sequencing for the presence of *GRN* mutations as previously described [28].

Nineteen patients (12 nfvPPA and seven lvPPA) consented to a lumbar puncture to study AD biomarkers ($A\beta_{42}$, total-tau, phosphorylated-tau₁₈₁). CSF AD biomarkers were measured using ELISA kits (Innogenetics, Ghent, Belgium) and were considered suggestive of AD pathology if $A\beta_{42}$ was < 500 pg/ml and T-tau > 450 pg/ml and/or P-tau > 75 pg/ml [29] or $A\beta_{42}$ /P-tau ratio < 6.43 [30].

¹²³I-FP-CIT SPECT

¹²³I-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropine (¹²³I-FP-CIT)-SPECT imaging (DaTSCAN; GE Healthcare, Eindhoven, Netherlands) was performed at inclusion. Patients who took drugs that could interfere with ¹²³I-FP-CIT striatal uptake (citalopram or escitalopram) [31] were asked to

discontinue them 10 days before the ¹²³I-FP-CIT-SPECT acquisition.

Visual assessment of the ¹²³I-FP-CIT-SPECT imaging was performed by a physician experienced in nuclear medicine, blind to the patients' clinical data. ¹²³I-FP-CIT-SPECT imaging acquisition and quantification were performed as previously described [19]. The striatal-to-occipital cortex uptake ratios for the putamen, caudate nuclei and entire striatum were calculated for each hemisphere. The asymmetry index for the whole striatum was also calculated to assess differences between hemispheres. The specific striatal-to-occipital cortex uptake ratio was regarded as abnormal (decreased) at the individual level when the value was < 2 SD of the mean of the specific striatal-to-occipital cortex uptake ratio measured in controls. Two patients (one lvPPA and one nfvPPA) with ¹²³I-FP-CIT-SPECT performed in a different scanner were excluded from the semi-quantitative analysis but not from the visual assessment.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the PASW 19.0 statistical package (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Quantitative data are expressed as means and SD. Owing to the small sample size in some group analyses and the non-parametric distribution of several quantitative variables, Mann-Whitney *U*-test was performed to compare all quantitative variables. Fisher's exact test was used to compare categorical data. The significance level was set at $P < 0.05$.

Results

Demographic and clinical features

Demographic data of the 15 nfvPPA and eight lvPPA patients are summarized in Table 1. The two groups did not differ in relation age of onset, years of education, age at first visit or duration of follow-up. There was a gender distribution difference in the logopenic group, in which all patients were women ($P < 0.05$). A family history of dementia or motor disorder was present in seven (47%) of the nfvPPA patients and one (12%) logopenic case ($P = 0.176$).

The severity of the PALS variables for both groups is shown in Table 1. As expected, nfvPPA and lvPPA differed in the semi-quantitative assessment of agrammatism, motor speech disorders and impaired sentence repetition. Word-finding difficulties was the first and most salient symptom reported in seven (87%) logopenic and five (33%) non-fluent/agrammatic patients, whereas motor speech difficulties were the

Table 1 Demographic and clinical features of nfvPPA and lvPPA participants

	nfvPPA (<i>n</i> = 15)	lvPPA (<i>n</i> = 8)	<i>P</i> -value
Demographics			
Gender, male (%)	8	0	< 0.05
Education (years)	10.47 (5.5)	9.6 (5.1)	NS
Age at onset (years)	63.6 (7.2)	64.6 (7.1)	NS
Age at first visit (years)	66.4 (8.0)	67.8 (7.2)	NS
Age at ¹²³ I-FP-CIT-SPECT (years)	67.8 (7.7)	68.1 (7.2)	NS
Disease duration at ¹²³ I-FP-CIT-SPECT (years)	4.2 (2.7)	3.3 (2.4)	NS
¹²³ I-FP-CIT-SPECT follow-up (years)	2.0 (0.8)	2.1 (1.0)	NS
PALS variables			
Motor speech disorder	2.0 (0.8)	0	< 0.001
Agrammatism	1.6 (0.7)	0.1 (0.3)	< 0.001
Naming	1 (2.2)	1.3 (1)	NS
Single-word comprehension	0	0	NS
Single-word repetition	1.2 (1.4)	0.7 (0.7)	NS
Sentence comprehension	0.2 (0.5)	0.3 (0.7)	NS
Sentence repetition	0.9 (1.0) ^a	2.1 (1.1)	< 0.05

¹²³I-FP-CIT, ¹²³I-2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropane; nfvPPA, non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia; lvPPA, logopenic variant of primary progressive aphasia; NS, not significant; PALS, Progressive Aphasia Language Scale.

All data, except for gender, are expressed as means (SD). *P*-value: Mann-Whitney or two-tailed Fisher's test as appropriate.

^aFour patients with severe motor speech disorder (PALS = 3) were excluded.

main complaint in nine non-fluent/agrammatic cases (60%). One logopenic patient complained about phonemic paraphasias at onset and one non-fluent/agrammatic patient consulted because of grammatical errors. On clinical examination, seven non-fluent/agrammatic patients (47%) presented with AOS, seven (47%) had mixed features of AOS and agrammatism and only one (6%) presented with isolated agrammatism.

Biochemical and genetic biomarkers

The frequency of *APOE* ε4 carriers was higher, but not significantly, in the logopenic group (43%) than in the non-fluent/agrammatic group (6%) (*P* = 0.07). One nfvPPA patient presented abnormal serum progranulin levels (53.3 ng/ml) and *GRN* sequencing demonstrated the presence of the *p.C366fsXI* mutation. This patient presented with mild features of agrammatism and effortful speech with speech sound distortions related to AOS. On follow-up, speech output is progressively reducing and AOS is becoming more severe. This patient was excluded from subsequent analysis based on biochemical classification.

Patients who consented to the lumbar puncture were subsequently subclassified into two biomarker-

enriched groups. Patients clinically classified as nfvPPA with both normal serum progranulin levels and CSF AD biomarkers were classified as nfvPPA/bio- (*n* = 10). Patients clinically defined as lvPPA who showed normal serum progranulin levels and a CSF profile suggestive of AD pathology were classified as lvPPA/bioAD (*n* = 6). None of the non-fluent/agrammatic patients presented an AD CSF profile. As predicted, the mean levels of Aβ₄₂ were significantly reduced (341 vs. 583 pg/ml, *P* < 0.001) and total-tau and phosphorylated-tau₁₈₁ mean levels were significantly higher (684 vs. 263 pg/ml, *P* < 0.005; 106.4 vs. 46.5 pg/ml, *P* < 0.001) in the lvPPA/bioAD group than in the nfvPPA/bio- group. lvPPA/bioAD patients also presented a lower Aβ₄₂/P-tau ratio (3.69 ± 1.58) than nfvPPA/bio- patients (13.83 ± 4.11) (*P* < 0.001).

¹²³I-FP-CIT-SPECT: visual assessment analysis

Eleven of 15 (73%) non-fluent/agrammatic patients (two in both putamina, three in the left putamen, one in the left striatum and five in the whole striatum) and eight of 10 (80%) nfvPPA/bio- patients showed a reduction in tracer uptake on visual inspection. All logopenic and control subjects presented normal ¹²³I-FP-CIT scans.

¹²³I-FP-CIT-SPECT: semi-quantitative analysis

The 14 non-fluent/agrammatic patients, as a group, compared with healthy controls, showed significantly reduced mean tracer uptake in both striata (Table 2). The asymmetry index for the whole striatum was also significantly reduced, due to a higher degree of tracer uptake reduction in the left hemisphere. In addition, non-fluent/agrammatic patients showed a significantly reduced caudate/putamen ratio in the left hemisphere because of a higher reduction in caudate uptake. There was no significant reduction in the striatum uptake in the seven logopenic cases compared with healthy controls, or in the clinically defined nfvPPA group compared with the lvPPA group. With regard to the biomarker-enriched groups, the nfvPPA/bio-group also showed significantly lower mean ratios in both striata compared with controls (Table 3), but this was not the case for the lvPPA/bioAD group compared with healthy controls. Significant differences were observed between the two biomarker-enriched groups, as there was a reduction in uptake in both striata in the nfvPPA/bio- group compared with the lvPPA/bioAD group (Table 3).

Table 4 summarizes the number of patients with quantitatively reduced tracer uptake at the individual level. Sixty-four per cent of nfvPPA patients and 80%

Table 2 Mean striatal ¹²³I-FP-CIT uptake ratios in nfvPPA and lvPPA patients and controls

	nfvPPA (n = 14)	lvPPA (n = 7)	Controls (n = 18)	nfvPPA vs. controls	nfvPPA vs. lvPPA	lvPPA vs. controls
LEFT striatum:occipital	2.12 (0.61)	2.48 (0.40)	2.58 (0.22)	0.002	NS	NS
LEFT caudate:occipital	2.32 (0.66)	2.79 (0.57)	2.98 (0.37)	0.003	NS	NS
LEFT putamen:occipital	2.02 (0.61)	2.32 (0.37)	2.37 (0.20)	0.004	NS	NS
LEFT caudate/putamen	1.15 (0.15)	1.19 (0.16)	1.25 (0.14)	0.027	NS	NS
RIGHT striatum:occipital	2.24 (0.57)	2.53 (0.26)	2.51 (0.22)	0.045	NS	NS
RIGHT caudate:occipital	2.56 (0.67)	2.88 (0.40)	2.98 (0.35)	0.022	NS	NS
RIGHT putamen:occipital	2.08 (0.55)	2.35 (0.18)	2.27 (0.19)	NS	NS	NS
RIGHT caudate/putamen	1.23 (0.17)	1.21 (0.16)	1.31 (0.12)	NS	NS	NS
ASYMMETRY left/right striatum	0.94 (0.11)	0.97 (0.08)	1.03 (0.05)	0.014	NS	NS

¹²³I-FP-CIT, ¹²³I-2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropane; nfvPPA, non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia; lvPPA, logopenic variant of primary progressive aphasia; NS, not significant. All striatal-to-occipital binding ratios are expressed as means (SD). *P*-value: Mann–Whitney test.

Table 3 Mean striatal ¹²³I-FP-CIT uptake ratios in nfvPPA/bio- and lvPPA/bioAD patients and controls

	nfvPPA/bio- (n = 10)	lvPPA/bioAD (n = 6)	Controls (n = 18)	nfvPPA/bio- vs. controls	nfvPPA/bio- vs. lvPPA/bioAD	lvPPA/bioAD vs. controls
LEFT striatum:occipital	1.97 (0.61)	2.54 (0.41)	2.58 (0.22)	< 0.001	0.042	NS
LEFT caudate:occipital	2.08 (0.57)	2.88 (0.56)	2.98 (0.37)	< 0.001	0.073	NS
LEFT putamen:occipital	1.91 (0.65)	2.36 (0.39)	2.37 (0.20)	0.001	0.031	NS
LEFT caudate/putamen	1.10 (0.12)	1.22 (0.17)	1.25 (0.14)	0.009	NS	NS
RIGHT striatum:occipital	2.07 (0.54)	2.58 (0.25)	2.51 (0.22)	0.004	0.022	NS
RIGHT caudate:occipital	2.34 (0.66)	2.98 (0.45)	2.98 (0.35)	0.001	0.042	NS
RIGHT putamen:occipital	1.94 (0.51)	2.38 (0.19)	2.27 (0.19)	0.018	0.042	NS
RIGHT caudate/putamen	1.21 (0.19)	1.25 (0.15)	1.31 (0.12)	NS	NS	NS
ASYMMETRY left/right striatum	0.94 (0.14)	0.97 (0.09)	1.03 (0.05)	0.09	NS	NS

¹²³I-FP-CIT, ¹²³I-2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropane; nfvPPA, non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia; lvPPA, logopenic variant of primary progressive aphasia; nfvPPA/bio-, non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia with negative biochemical markers (progranulin serum levels and cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers); lvPPA/bioAD, logopenic variant of primary progressive aphasia with positive cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers; NS, not significant. All striatal-to-occipital binding ratios are expressed as means (SD). *P*-value: Mann–Whitney test.

Table 4 Reduced ¹²³I-FP-CIT uptake at individual level in nfvPPA, lvPPA, nfvPPA/bio- and lvPPA/bioAD patients

	nfvPPA (N = 14)	lvPPA (N = 7)	nfvPPA vs. lvPPA <i>P</i> value	nfvPPA/bio- (N = 10)	lvPPA/bioAD (N = 6)	nfvPPA/bio- vs. lvPPA/bioAD <i>P</i> -value
LEFT striatum:occipital	9 (64%)	1 (14%)	0.04	8 (80%)	1 (16%)	0.02
RIGHT striatum:occipital	6 (42%)	0	0.05	6 (60%)	0	0.02

¹²³I-FP-CIT, ¹²³I-2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)-nortropane; nfvPPA, non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia; lvPPA, logopenic variant of primary progressive aphasia; nfvPPA/bio-, non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia with negative biochemical markers (progranulin serum levels and cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers); lvPPA/bioAD, logopenic variant of primary progressive aphasia with positive cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers; NS, not significant. All data are *n* (%). *P*-value: two-tailed Fisher's test.

of nfvPPA/bio- patients presented reduced uptake values in the left striatum, a significantly higher percentage than was the case with lvPPA patients (1/7, 14%) or lvPPA/bioAD patients (1/6, 16%) (*P* = 0.043; *P* = 0.035).

Follow-up

This study was designed as a cross-sectional study. However, at the time of data analysis there was already

some follow-up data that could be of interest. Clinically relevant parkinsonism (bradykinesia or rigidity that caused gait problems and/or postural instability with unexpected falls) was observed in nine of the 15 (60%) non-fluent/agrammatic patients, six resembling a PSP syndrome, two CBS and one mixed PSP-CBS phenotype. Parkinsonism appeared at a median (range) of 6 years (3.4–11.8) years from the first symptom and after a median (range) of 1.9 (1.2–2.9) years from the ¹²³I-FP-CIT-SPECT examination. The other six

non-fluent/agrammatic patients remain free of motor signs after a median (range) follow-up from symptom onset of 3.3 (2.9–12.2) years. On the other hand, six out of nine non-fluent/agrammatic patients who presented reduced baseline left striatal ^{123}I -FP-CIT uptake and five out of six patients with reduced ^{123}I -FP-CIT uptake in both striata (5/5 with more than 1 year follow-up) have already developed parkinsonism. None of the logopenic patients have developed significant extrapyramidal features during follow-up.

Within the biomarker-enriched groups, seven of 10 (70%) nfvPPA/bio- patients presented clinical features of parkinsonism on follow-up. Six of these (85%) showed reduced baseline ^{123}I -FP-CIT binding in the left striatum. The patient with a normal ^{123}I -FP-CIT-SPECT developed parkinsonism 2.41 years after scan acquisition, 6.9 years from disease onset. Three nfvPPA/bio- patients did not develop clinical features of parkinsonism on follow-up. Two of them exhibited a reduced left striatal uptake ratio compared with controls: one patient died 1.4 years after ^{123}I -FP-CIT-SPECT and the other has only been in follow-up for a short period (0.41 year). The third nfvPPA/bio-patient without parkinsonism showed normal striatal ^{123}I -FP-CIT uptake. He presented with agrammatic language problems and developed severe behavioural abnormalities, meeting the criteria for the frontal variant of FTLD.

Discussion

For the purpose of this investigation, the nigrostriatal pathway was evaluated using ^{123}I -FP-CIT-SPECT neuroimaging in a group of 23 PPA patients: 15 nfvPPA patients, eight lvPPA patients and 18 healthy controls. It was found that non-fluent/agrammatic patients without baseline parkinsonism already presented reduced ^{123}I -FP-CIT uptake in the striatum. Moreover, when incorporating available biochemical markers (serum progranulin levels and CSF AD biomarkers), the differences in striatal tracer uptake between the nfvPPA/bio- group versus the lvPPA/bioAD and controls appeared even more acute. The follow-up of these patients supports the hypothesis that decreased striatal ^{123}I -FP-CIT uptake identified PPA patients who are at high risk of developing clinical parkinsonism. To the best of our knowledge, this is the first study that has assessed subclinical nigrostriatal degeneration *in vivo* in non-fluent/agrammatic patients.

^{123}I -FP-CIT in nfvPPA

Previous studies have consistently shown that ^{123}I -FP-CIT-SPECT is able to detect dopaminergic nigro-

striatal dysfunction *in vivo* in patients suffering from extrapyramidal syndromes of different neurodegenerative origin, such as PD, Lewy body dementia, PSP, CBD or multiple system atrophy (MSA) [31], and even in patients at risk who have not yet developed clinical parkinsonism, such as those with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder [19] and asymptomatic carriers of mutations in the Parkin gene (PARK2) and the PINK1 gene (PARK6) [20]. Rinne *et al.* evaluated the nigrostriatal degeneration in 12 patients with clinical frontotemporal dementia (FTD), using a cocaine analogue [11C] 2- β -Carbomethoxy-3- β -(4-fluorophenyl)tropane as a ligand, with PET and found that the dopamine transporter uptake was reduced in the FTD group compared with controls [32]. However, in Rinne *et al.*'s study, the binding of the dopamine transporter ligand was very heterogeneous at the individual level and it is not clear if this heterogeneity could be related to the different neuropathological substrates of FTD or to the severity of extrapyramidal symptoms of the patients. In the present study, non-fluent/agrammatic PPA patients without clinical parkinsonism already showed significantly reduced mean tracer uptake, both quantitatively and at visual inspection, in striatum compared with healthy controls. This reduction in striatal ^{123}I -FP-CIT uptake in non-fluent/agrammatic patients without clinical parkinsonism is interpreted as a marker of subclinical nigrostriatal neurodegeneration in these patients. By contrast, no significant differences were found between lvPPA patients and controls, indicating the lack of significant dopaminergic striatal neurodegeneration in logopenic patients. After further analysis of the ^{123}I -FP-CIT-SPECT data, taking into account CSF AD biomarkers and excluding *GRN* mutations carriers with the aim of enriching the presence of FTLD-tau cases in the nfvPPA group and AD cases in the lvPPA group, the reduction in striatal tracer uptake was found to be even more significant in the nfvPPA/bio- group with respect to controls. In addition, the differences between nfvPPA/bio- and lvPPA/bioAD patients became statistically significant, suggesting that the assessment of available *in vivo* biomarkers helped to homogenize the groups and that the biomarkers improved the effect of clinical diagnosis in the striatal binding abnormality.

^{123}I -FP-CIT uptake pattern in nfvPPA

The left/right striatum asymmetry index was diminished in non-fluent/agrammatic patients as a group compared with controls, revealing a higher reduction in the left striatum. This finding could be explained by the preferential affection of the left fronto-insular-basal ganglia network in non-fluent/agrammatic

patients [4–10]. Previous studies that have performed semi-quantitative analysis of ^{123}I -FP-CIT-SPECT to discriminate PD and other atypical parkinsonisms, such as PSP and CBD, support the idea that PSP patients present more severe and symmetric tracer uptake loss than PD patients [18], whilst in CBD the uptake loss is also asymmetric [31]. PSP is also characterized by a more widespread loss of the dopamine neurons in the *pars compacta* of the *substantia nigra*, affecting not only the projections to the putamen but also the projections to the caudate, which is reflected in the ^{123}I -FP-CIT-SPECT uptake pattern [33]. Similar findings are seen in CBD [17]. By contrast, PD presents a different ratio of caudate/putamen reduction of tracer uptake, where loss of tracer uptake was more pronounced in the posterior part of the putamen. In the present study, the left caudate/putamen ratio in non-fluent/agrammatic patients was reduced with respect to controls. This indicates that the loss of tracer uptake is higher in the caudate than in the putamen, in contrast to PD, and more similar to PSP/CBD [34]. In the same sense, in FTD patients, dopamine transporter uptake seems also to be reduced to the same degree in the putamen and caudate nucleus [32].

^{123}I -FP-CIT uptake reduction as a potential biomarker in PPA

It is now well recognized that nfvPPA can be the presenting syndrome of CBD and PSP subtypes of FTLD-tau [4,35,36], which are characterized by nigrostriatal neurodegeneration with neuronal loss and gliosis in basal ganglia and substantia nigra in addition to tau deposits [37–39]. Many, but not all, non-fluent/agrammatic patients evolve from a pure cognitive process to a mixed cognitive-motor syndrome with atypical parkinsonism suggestive of CBS, PSP or an intermediate phenotype, most often associated with FTLD-tau neuropathology [40–43]. Furthermore, patients with an isolated AOS can also develop parkinsonian features later in the disease course and, although AOS may remain isolated, non-fluent/agrammatic aphasia can also emerge later at any stage of the disease [4]. However, the recent consensus classification of PPA includes within the nfvPPA variant patients with agrammatism and/or AOS, a disorder of speech motor planning or programming with preservation of other language functions [13]. Different authors have highlighted the importance of differentiating both entities [44,45] and Josephs and collaborators proposed the term of primary progressive AOS (PPAOS) for patients with an isolated AOS in the absence of aphasia or obvious signs of a prominent

motor disorder, such as CBS or PSP. In this sense, seven of our nfvPPA patients would meet the criteria for PPAOS. Moreover, these authors had previously reported the association of AOS with underlying tau pathology, mainly four-repeat tauopathies and, therefore, there is evidence to suggest that the most likely pathology associated with PPAOS is FTLD-tau, either CBD or PSP [4–8].

In the present series, 70% of nfvPPA/bio- patients had developed extrapyramidal features of atypical parkinsonism at the time of data analysis, even though the longitudinal data in our study are limited, as some patients have only had a short follow-up. Most of them (85%) already showed abnormal striatal ^{123}I -FP-CIT uptake at baseline. Likewise, all patients with an abnormal bilateral striatal uptake ratio and sufficiently long follow-up have developed clinical parkinsonism. None of the lvPPA patients developed parkinsonism at follow-up. In the same sense, a previous study demonstrated that parkinsonian motor features, especially bradykinesia and speech/facial expression, are more frequent in nfvPPA than in lvPPA patients, possibly reflecting the relationship between underlying tau pathology and parkinsonism in nfvPPA [21]. Our findings support the hypothesis that reduced striatal ^{123}I -FP-CIT uptake may predict evolution towards a clinical parkinsonian syndrome in PPA patients, probably related to FTLD-tau pathology. Only one nfvPPA/bio- patient, who developed parkinsonism 2.41 years after neuroimaging, had a normal baseline ^{123}I -FP-CIT-SPECT. This could indicate that dopaminergic degeneration was not present at onset, is a false negative of the technique, or that the biological substrate of this nfvPPA/bio- patient is not PSP/CBD.

Limitations

Although ^{123}I -FP-CIT-SPECT is a putative *in vivo* biomarker of nigrostriatal degeneration, a post-mortem neuropathological confirmation of the cases studied would be desirable. The most relevant limitation in our series is the lack of a confirmed neuropathological diagnosis to support the association of non-fluent/agrammatic patients, with abnormal ^{123}I -FP-CIT-SPECT neuroimaging and/or parkinsonism, with FTLD-tau pathology. However, many previous reports based on ^{123}I -FP-CIT-SPECT findings in different neurodegenerative syndromes also lack neuropathological data [18,19]. Another limitation of the study is the small number of subjects included in the study. However, the sample size is similar to some other exploratory studies in this field and demands that our findings be confirmed in other cohorts. Finally, a longer follow-up period is necessary to

determine whether an atypical parkinsonian syndrome will emerge in other non-fluent/agrammatic or logopenic patients.

Conclusions

Understanding disease evolution and neuropathological prediction in neurodegenerative conditions such as PPA remains controversial, and incorporating current available biomarkers that detect pathological changes *in vivo* can be very helpful. ^{123}I -FP-CIT-SPECT detects reduced tracer uptake in the striatum in non-fluent/agrammatic patients without baseline parkinsonism. This finding supports the existence of subclinical nigrostriatal degeneration in nfvPPA and suggests that decreased striatal ^{123}I -FP-CIT binding might help to improve prognosis prediction in nfvPPA. This study has provided further insights into the biological features of nfvPPA and highlighted ^{123}I -FP-CIT-SPECT scanning as a potential tool to identify PPA patients at increased risk of developing a parkinsonian syndrome, probably related to FTLT-tau. Further studies that include neuropathological data, larger samples and a longer follow-up period are needed to confirm these findings.

Acknowledgements

This study was partially supported by the following grants: R. Sánchez-Valle (GE Healthcare BioSciences, S.A.), J.L. Molinuevo (Instituto de Salud Carlos III, CSD2010-00045), L. Rami (Instituto de Salud Carlos III, CP 08/00147), A. Lladó (Instituto de Salud Carlos III, PI11/00234) and M. Balasa (IDIBAPS), A. Antonell (Instituto de Salud Carlos III, CSD2010-00045). The funding organizations and sponsors did not participate in or influence the design or conduct of the study; the collection, management, analysis or interpretation of the data; or the preparation, review or approval of the manuscript.

Disclosure of conflict of interest

F. Lomeña participates in GE Healthcare Biosciences and Bayern scientific advisory boards and serves on the speakers' bureau for GE Healthcare Biosciences, MSD and Nucliber. J. Pavia is GE Healthcare Biosciences S.A. consultant for advice on quality control aspects of Medicine Nuclear instrumentation related to brain SPECT neurotransmission studies, and serves on the speakers' bureau for GE Healthcare Biosciences. J.L. Molinuevo has provided scientific advice or has been an investigator or data monitoring board member for consultancy fees from Pfizer, Eisai, MSD,

Merz, Janssen-Cilag, Novartis, Lundbeck, Roche, Bayer, Bristol-Myers Squibb, GE Health Care, Glaxo-SmithKline, and Innogenetics. R. Sánchez-Valle received lecture fees from Novartis, Jansen-Cilag and Esteve.

References

- Grossman M. The non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia. *Lancet Neurol* 2012; **11**: 545–555.
- Grossman M, Moore P. A longitudinal study of sentence comprehension difficulty in primary progressive aphasia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; **76**: 644–649.
- Kertesz A, McMonagle P, Blair M, *et al.* The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain* 2005; **128**: 1996–2005.
- Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, *et al.* Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. *Brain* 2006; **129**: 1385–1398.
- Murray R, Neumann M, Forman MS, *et al.* Cognitive and motor assessment in autopsy-proven corticobasal degeneration. *Neurology* 2007; **68**: 1274–1283.
- Knibb JA, Xuereb JH, Patterson K, *et al.* Clinical and pathological characterization of progressive aphasia. *Ann Neurol* 2006; **59**: 156–165.
- Alladi S, Xuereb J, Bak T, *et al.* Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. *Brain* 2007; **130**: 2636–2645.
- Deramecourt V, Lebert F, Debachy B, *et al.* Prediction of pathology in primary progressive language and speech disorders. *Neurology* 2010; **74**: 42–49.
- Snowden J, Neary D, Mann D. Frontotemporal lobar degeneration: clinical and pathological relationships. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 31–38.
- Gorno-Tempini ML, Dronkers NF, Rankin KP, *et al.* Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2004; **55**: 335–346.
- Mesulam M, Wicklund A, Johnson N, *et al.* Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2008; **63**: 709–719.
- Weintraub S, Rubin NP, Mesulam MM. Primary progressive aphasia. Longitudinal course, neuropsychological profile, and language features. *Arch Neurol* 1990; **47**: 1329–1335.
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, *et al.* Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011; **76**: 1006–1014.
- Benamer HT, Patterson J, Wyper DJ, *et al.* Correlation of Parkinson's disease severity and duration with ^{123}I -FP-CIT SPECT striatal uptake. *Mov Disord* 2000; **15**: 692–698.
- McKeith I, O'Brien J, Walker Z, *et al.* Sensitivity and specificity of dopamine transporter imaging with ^{123}I -FP-CIT SPECT in dementia with Lewy bodies: a phase III, multicentre study. *Lancet Neurol* 2007; **6**: 305–313.
- Pirker W, Djamshidian S, Asenbaum S, *et al.* Progression of dopaminergic degeneration in Parkinson's disease and atypical parkinsonism: a longitudinal beta-CIT SPECT study. *Mov Disord* 2002; **17**: 45–53.
- Klaffke S, Kuhn AA, Plotkin M, *et al.* Dopamine transporters, D2 receptors, and glucose metabolism in corticobasal degeneration. *Mov Disord* 2006; **21**: 1724–1727.

18. Filippi L, Manni C, Pierantozzi M, *et al.* 123I-FP-CIT in progressive supranuclear palsy and in Parkinson's disease: a SPECT semiquantitative study. *Nucl Med Commun* 2006; **27**: 381–386.
19. Iranzo A, Valldeoriola F, Lomena F, *et al.* Serial dopamine transporter imaging of nigrostriatal function in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study. *Lancet Neurol* 2011; **10**: 797–805.
20. Pellecchia MT, Varrone A, Annesi G, *et al.* Parkinsonism and essential tremor in a family with pseudo-dominant inheritance of PARK2: an FP-CIT SPECT study. *Mov Disord* 2007; **22**: 559–563.
21. Graff-Radford J, Duffy JR, Strand EA, Josephs KA. Parkinsonian motor features distinguish the agrammatic from logopenic variant of primary progressive aphasia. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; **18**: 890–892.
22. Gil-Navarro S, Lladó A, Rami L, *et al.* Neuroimaging and biochemical markers in the three variants of primary progressive aphasia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2013; **35**: 106–117.
23. Leyton CE, Villemagne VL, Savage S, *et al.* Subtypes of progressive aphasia: application of the International Consensus Criteria and validation using beta-amyloid imaging. *Brain* 2011; **134**: 3030–3043.
24. Goodglass H, Kaplan E. *Valuación de la afasia y de otros trastornos relacionados*. 2nd edn. (García-Albea JE, Sánchez-Bernardos ML, del Viso S, versión). Madrid: Editorial Médica Panamericana, 1996.
25. Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S. *The Boston Naming Test, Experimental Edition. Boston Naming Test*, 2nd edn. Philadelphia: Lippincott Williams, 2001.
26. Borkowski JG, Benton AL, Speen O. Word fluency and brain damage. *Neuropsychologia* 1967; **5**: 135–140.
27. Howard D, Patterson K. *Pyramids and Palm Trees: A Test of Semantic Access from Pictures and Words*. Bury St Edmunds, Suffolk: Thames Valley Publishing Company, 1992.
28. Antonell A, Gil S, Sanchez-Valle R, *et al.* Serum progranulin levels in patients with frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease: detection of GRN mutations in a Spanish cohort. *J Alzheimers Dis* 2012; **31**: 581–591.
29. Antonell A, Fortea J, Rami L, *et al.* Different profiles of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers in controls and subjects with subjective memory complaints. *J Neural Transm* 2011; **118**: 259–262.
30. Welge V, Fiege O, Lewczuk P, *et al.* Combined CSF tau, p-tau181 and amyloid-beta 38/40/42 for diagnosing Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009; **116**: 203–212.
31. Kagi G, Bhatia KP, Tolosa E. The role of DAT-SPECT in movement disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; **81**: 5–12.
32. Rinne JO, Laine M, Kaasinen V, Norvasuo-Heila MK, Nagren K, Helenius H. Striatal dopamine transporter and extrapyramidal symptoms in frontotemporal dementia. *Neurology* 2002; **58**: 1489–1493.
33. Oh M, Kim JS, Kim JY, *et al.* Subregional patterns of preferential striatal dopamine transporter loss differ in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and multiple-system atrophy. *J Nucl Med* 2012; **53**: 399–406.
34. Braak H, Del Tredici K, Rub U, *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; **24**: 197–211.
35. Kertesz A, Martinez-Lage P, Davidson W, *et al.* The corticobasal degeneration syndrome overlaps progressive aphasia and frontotemporal dementia. *Neurology* 2000; **55**: 1368–1375.
36. Josephs KA, Boeve BF, Duffy JR, *et al.* Atypical progressive supranuclear palsy underlying progressive apraxia of speech and nonfluent aphasia. *Neurocase* 2005; **11**: 283–296.
37. Braak H, Jellinger K, Braak E, *et al.* Allocortical neurofibrillary changes in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 1992; **84**: 478–483.
38. Dickson DW. Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol* 1999; **246**: II6–II15.
39. Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, *et al.* Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; **61**: 935–946.
40. Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, *et al.* Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2004; **56**: 399–406.
41. Forman MS, Farmer J, Johnson JK, *et al.* Frontotemporal dementia: clinicopathological correlations. *Ann Neurol* 2006; **59**: 952–962.
42. Sanchez-Valle R, Forman MS, Miller BL, *et al.* From progressive nonfluent aphasia to corticobasal syndrome: a case report of corticobasal degeneration. *Neurocase* 2006; **12**: 355–359.
43. Grossman M, Xie SX, Libon DJ, *et al.* Longitudinal decline in autopsy-defined frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2008; **70**: 2036–2045.
44. Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, *et al.* Characterizing a neurodegenerative syndrome: primary progressive apraxia of speech. *Brain* 2012; **135**: 1522–1536.
45. Mesulam MM, Wieneke C, Thompson C, *et al.* Quantitative classification of primary progressive aphasia at early and mild impairment stages. *Brain* 2012; **135**: 1537–1553.

VII. Discusión

A través de los distintos trabajos de investigación que conforman la presente memoria de tesis doctoral, se ha pretendido ahondar en el conocimiento de las características clínicas y de neuroimagen clínica de la APP, bajo las directrices marcadas en la nueva clasificación de consenso internacional para la investigación de la APP. Asimismo, se han evaluado nuevos biomarcadores no incluidos explícitamente en dichos criterios, como los marcadores bioquímicos de EA en LCR, los niveles séricos de progranulina o marcadores genéticos y se ha explorado el potencial uso del estudio de la vía nigroestriatal como nuevo biomarcador de neuroimagen en APP.

En el primer trabajo se evaluó prospectivamente una cohorte clínica de APP, definida por criterios clínicos (Mesulam et al., 2001; Gorno-Tempini et al., 2011). La aplicación de los criterios de diagnóstico recientemente publicados de las tres variantes de la APP (Gorno-Tempini et al., 2011) permitió la subclasificación de la mayoría de los pacientes, resaltando la aplicabilidad prospectiva de estos criterios a nivel clínico. Sin embargo, el 15,6% de los pacientes no cumplían alguno de los criterios establecidos, permaneciendo por tanto inclasificables (APP-i). En este mismo trabajo se evaluó la aplicabilidad clínica de los criterios de neuroimagen estructural y funcional de apoyo al diagnóstico de la APP, mostrando una excelente asociación entre los criterios clínicos y de neuroimagen propuestos en las variantes APP-vs y APP-vl. Finalmente, se estudiaron diversos marcadores bioquímicos y genéticos en los sujetos con APP, evidenciándose que todos los pacientes con APP-vl y la mayoría de aquéllos con APP-i, presentaban un perfil bioquímico en LCR sugestivo de patología de EA subyacente. Por su parte, la APP-vnf mostró la mayor heterogeneidad a nivel de marcadores de neuroimagen y bioquímicos.

Desde el punto de vista clínico, la escala del lenguaje para la afasia progresiva (PALS) (Leyton et al., 2011), adaptada a pacientes castellanoparlantes, se mostró una herramienta útil en la detección de alteraciones del lenguaje claves para clasificar a los pacientes de APP en las tres variantes clínicas. Desde un punto de vista sintomático, en nuestra cohorte, pacientes con las tres variantes clínicas de APP se quejaron inicialmente de dificultad para encontrar las palabras. Todos ellos presentaron anomia, tanto en la evaluación del lenguaje mediante la PALS como en la evaluación neuropsicológica, si bien con severidades diferentes entre los grupos, dado que el mecanismo lingüístico subyacente a este síntoma es diferente en cada variante (Hodges et al., 1996; Gorno-Tempini et al., 2004; Mesulam et al., 2012). Así, los pacientes con APP-vs, debido a la alteración primaria del almacén semántico que padecen, fueron los que presentaron una anomia más llamativa en la PALS y obtuvieron las puntuaciones más bajas en el BNT. Tal suele ser la severidad de la anomia en la APP-vs, que algunos autores han sugerido que una anomia inicialmente aislada, con preservación de

la comprensión de palabras aisladas y del reconocimiento de objetos, puede considerarse un estadio prodrómico de la APP-vs (Mesulam et al., 2012). En nuestra cohorte, la anomia, al igual que el agramatismo, la apraxia del habla, la comprensión de palabras aisladas y la repetición de frases largas, fueron cinco de las siete variables de la PALS que mostraron diferencias significativas entre los cuatro grupos clínicos analizados. Sin embargo, hay que recalcar que la anomia, al carecer de valor discriminativo *per se*, no fue incluida como una de las cuatro variables lingüísticas clave en el algoritmo clasificatorio de la APP propuesto por Leyton y col (Leyton et al., 2012). Por el contrario, las otras cuatro variables clave de este algoritmo mostraron una mayor afectación en cada una de las variantes clínicas de APP de las que son criterio diagnóstico mayor. Así, los pacientes con APP-vnf obtuvieron mayores puntuaciones en los ítems de agramatismo y apraxia del habla, los pacientes con APP-vs en la comprensión de palabras aisladas y los pacientes con APP-vl mostraron una mayor afectación en la repetición de frases largas.

Un interesante hallazgo en nuestra cohorte fue la identificación de cinco casos (15,6%) de pacientes APP inclasificables (APP-i) según los recientes criterios diagnósticos. Cuatro de ellos presentaban una afectación del lenguaje extensa, cumpliendo criterios clínicos mayores de más de una variante de APP y un caso solamente presentó un criterio clínico mayor para el diagnóstico de APP-vl. La posibilidad de que el perfil clínico de los pacientes APP-i se debiera a una forma más avanzada de la enfermedad, con mayores déficits del lenguaje, no se vio apoyada por la duración de la enfermedad, que fue similar en todos los grupos. Otros estudios de APP publicados tras la clasificación de consenso también han reportado porcentajes similares (12%) (Mesulam et al., 2012) o incluso mayores (40%) (Sajjadi et al., 2012) de pacientes inclasificables o con un fenotipo de lenguaje “mixto”. En nuestra serie, siguiendo la propuesta del grupo de Mesulam (Mesulam et al., 2012) tres de los pacientes APP-i podrían haberse clasificados como APP “mixta”, pues presentaban tanto agramatismo como afectación de la comprensión de palabras aisladas. Además, dos de estos pacientes, al igual que varios de los casos de la citada serie de Mesulam, también presentaban afectación de la repetición de frases largas.

Por definición, ninguno de los pacientes con APP presentaba una afectación clínica relevante en dominios extralingüísticos en el momento de su inclusión. En la evaluación neuropsicológica normativa, la afectación de dominios cognitivos extralingüísticos fue muy leve en la mayoría de los casos. Los pacientes con APP-vs, fueron los que obtuvieron una menor puntuación en el test de memoria verbal. Resultados similares en el rendimiento de esta tarea se han obtenido en otras cohortes, debido a la afectación de la memoria semántica que padecen estos pacientes (Hodges et al., 2012). Por su parte, la memoria visual, evaluada

mediante la codificación y evocación de las figuras geométricas de la CERAD, se vio más afectada en los casos de APP-vl y de APP-i. La alteración de esta tarea, que implica no sólo la activación de regiones temporales mediales, sino del córtex prefrontal y parietal (Cabeza y Nyberg, 2000), sugiere la afectación de regiones anatómicas más extensas. Creemos que este hecho está íntimamente relacionado con la existencia de un sustrato de EA subyacente en ambos grupos clínicos de APP, como corroboran los resultados de los marcadores bioquímicos de EA en LCR. Además los pacientes APP-i, mostraron un mayor enlentecimiento en el TMT-A, una tarea que evalúa la velocidad para una combinación de habilidades motoras, de atención sostenida y de búsqueda visuo-espacial y cuya afectación en el estadio prodrómico de la EA predice el desarrollo de demencia (Molinuevo et al., 2011). Otras funciones cerebrales, como la percepción visuo-espacial y visuo-constructiva estuvieron preservadas en todos los subgrupos de pacientes con APP.

Los pacientes con APP-vnf obtuvieron las menores puntuaciones en las tareas de fluencia fonética, al igual que en otras cohortes (Hu et al., 2010; Sajjadi et al., 2012). Esta tarea, para muchos autores, más que ser una tarea primariamente lingüística, es considerada una tarea de ejecución frontal, pues está íntimamente relacionada con la generación de una estrategia de búsqueda en el almacén verbal y con la emisión del contenido verbal allí almacenado (Clark et al., 2005). La evaluación prospectiva de ésta y otras tareas ejecutivas en pacientes con APP-vnf, ha mostrado un declinar progresivo del rendimiento en estas pruebas conforme la enfermedad evoluciona, manifestando una creciente dificultad de los pacientes no-fluentes/agramaticales en tareas que requieren planificación mental, memoria de trabajo y realización de forma simultánea de dos tareas (Libon et al., 2007; Libon et al., 2008). En contra de lo esperado, las puntuaciones en el test de dígitos directos y la comprensión de frases, fueron similares en todos los grupos. Previamente, el grupo de la doctora Gorno-Tempini había descrito en los pacientes con APP-vl, una marcada reducción de la repetición de frases largas y de la repetición de dígitos directos, ambas relacionadas con una alteración en el loop fonológico (Gorno-Tempini et al., 2008). El loop fonológico, al igual que la memoria de trabajo, también juega un importante papel en la comprensión de frases, pues permite mantener online la información verbal que se recibe e interpretarla. Por este mismo mecanismo, la comprensión de frases también puede verse afectada en los pacientes logopénicos y esto puede falsamente similar a los errores que tienen los pacientes con APP-vnf en la comprensión de estructuras sintácticas complejas.

Otro punto a considerar es el creciente debate acerca de si los pacientes con una apraxia del habla aislada, sin rasgos de agramatismo verbal o escrito, deberían incluirse o no dentro de la variante APP-vnf. Tanto en publicaciones sobre los diversos subtipos de APP descritos

antes de la clasificación de consenso (Duffy, 2006; Josephs et al., 2006b; Rohrer et al., 2008a; Rohrer et al., 2010b; Deramecourt et al., 2010) como en otras posteriores (Mesulam et al., 2012; Josephs et al., 2012) se ha considerado la apraxia del habla aislada como una entidad neurodegenerativa con características patofisiológicas propias. En nuestra cohorte, aplicamos los criterios de consenso, que incluyen a la apraxia del habla con o sin afasia asociada, entre los criterios diagnósticos de la APP-vnf. Sin embargo, aunque siete de los 15 casos con APP-vnf incluidos presentaban una combinación de diversos grados de apraxia del habla y de agramatismo, otros siete de nuestros pacientes se presentaron inicialmente con una apraxia del habla aislada, cumpliendo criterios para ser diagnosticados de una apraxia del habla primaria progresiva.

Respecto a los hallazgos de neuroimagen, numerosos estudios grupales usando técnicas semi-cuantitativas como VBM o el estudio de grosor cortical, han establecido correlaciones clínico-anatómicas consistentes en cada variante de APP (Gorno-Tempini et al., 2004; Rohrer et al., 2009; Mesulam et al., 2009; Sapolsky et al., 2010; Rogalsky et al., 2011). Por otra parte, algunos estudios de técnicas de neuroimagen funcional, como el SPECT, PET o la RM funcional, han sugerido que la disfunción en las redes del lenguaje localizadas en el hemisferio izquierdo podrían anteceder al daño anatómico objetivado por RM en la APP (Mesulam, 2001; Diehl et al., 2004; Rohrer et al., 2008a). En nuestro trabajo 1 aplicamos clínicamente, los criterios de neuroimagen estructural y funcional de apoyo al diagnóstico de las tres variantes de APP. Con esta aproximación cualitativa, que es con la que se toman decisiones en la práctica clínica habitual, todos los casos de APP-vs y APP-vl de nuestra cohorte mostraron la positividad de al menos uno de los dos biomarcadores de neuroimagen. Además, en todos los casos de APP-vs en los que se disponían de ambos biomarcadores de neuroimagen, hubo una correspondencia completa entre la localización de la atrofia y el hipometabolismo a nivel temporal anterior izquierdo. Esta afectación relativamente focal del polo temporal izquierdo hace que esta región anatómica sea un excelente biomarcador de neuroimagen de la APP-vs, incluso en estadios iniciales (Mesulam et al., 2012). En la APP-vl, a pesar de que las diferencias no fueron significativas, la neuroimagen funcional parecía ser más sensible que la estructural a la hora de localizar anatómicamente la afectación focal típica de esta variante. Respecto a la APP-vnf, sólo un 66% de los casos presentaba algún biomarcador de imagen positivo, si bien se producía un alto grado de congruencia entre la neuroimagen estructural y funcional. Nuestros resultados sugieren, que el patrón de atrofia y/o hipometabolismo/hipoperfusión de apoyo al diagnóstico clínico que se ha señalado en los distintos estudios grupales, es de menor utilidad en la APP-vnf y APP-vl a nivel individual en la práctica clínica. Creemos que las razones de estas discrepancias en ambos grupos son, además de la variabilidad y heterogeneidad clínica individual, las diferencias

de sensibilidad diagnóstica que presentan las técnicas semi-cuantitativas utilizadas en estudios de investigación grupales respecto al análisis cualitativo clínico a nivel individual realizado en nuestra cohorte.

El uso de marcadores bioquímicos en LCR sugestivos de neuropatología de EA se está incorporando poco a poco a la práctica clínica en nuestro medio, especialmente para el estudio de pacientes en fase de deterioro cognitivo leve, demencia de inicio precoz o atípica. Sin embargo, los autores del consenso internacional de APP, si bien hacen referencia a ellos, no especifican cuál ha de ser su uso en un caso de APP, dado que faltan datos de series clínicas amplias bien estudiadas (Gorno-Tempini et al, 2011). En nuestro estudio, los resultados de los marcadores bioquímicos en LCR mostraron que todos los pacientes APP-vl presentaban un perfil sugestivo de patología de EA. Previamente, solamente Rohrer y col habían descrito cinco pacientes con APP-vl que presentaban un perfil de biomarcadores de EA en LCR (Rohrer et al 2010d; Rohrer et al, 2012), confirmando un dato aportado por los estudios de correlación clínico-patológicos (Mesualm et al., 2008). Además, en nuestra cohorte, en el 60% de los pacientes APP-i los marcadores bioquímicos en LCR apoyaban la presencia de una EA subyacente. Por el contrario, ninguno de los pacientes APP-vnf o APP-vs presentaron positividad de los biomarcadores de EA. Estudios previos con PET con marcadores de amiloide han mostrado un porcentaje pequeño de positividad en la captación cortical del radiotrazador en sujetos con estos dos tipos de variantes de la APP. Esta discrepancia puede explicarse por dos razones fundamentales. En primer lugar, los criterios de nuestro estudio para considerar que una muestra de LCR apoya el diagnóstico de un EA, requieren la presencia de $A\beta_{42}$ disminuida, indicativa de amiloidosis subyacente, y además, la elevación de t-tau, p-tau₁₈₁ o de la ratio $A\beta_{42}/p\text{-tau}_{181}$, indicativos de la existencia de daño neuronal asociado. En esta misma línea, dos de nuestros pacientes con APP-vnf (uno de ellos el portador de la mutación *p.C139R* en *GRN*) presentaron disminución de $A_{\beta 42}$ y niveles normales de biomarcadores de daño neuronal, algo que interpretamos como copatología. En segundo lugar, el 16% de nuestros pacientes con APP se consideraron inclasificables según la actual clasificación, pero se podrían haber clasificado previamente como APP-vnf o APP-vl, y el 60% de ellos presentaron un perfil de biomarcadores en LCR indicativo de neuropatología de EA.

Los marcadores genéticos son otro de los marcadores biológicos propuestos en el consenso internacional de APP para mejorar la predicción *in vivo* del sustrato molecular subyacente en cada caso de APP. El 34% de los pacientes con APP del trabajo 1 presentaban historia familiar de deterioro cognitivo en familiares de primer grado, si bien, ninguno de ellos estaba afecto de ELA. Solamente tres pacientes, todos ellos con APP-vnf, presentaron

antecedentes familiares de demencia de inicio precoz en familiares de primer grado. El estudio genético mostró que estos tres pacientes eran portadores de una mutación patogénica asociada a una DLFT (expansión hexanucleotídica en *C9ORF72* en dos casos y una mutación en *GRN* en el otro), apoyando la idea de que las alteraciones genéticas en la APP se asocian a la APP-vnf con más frecuencia que a la APP-vs o a la APP-vl (Grossman, 2012).

La frecuencia de la afasia como síntoma inicial en los portadores de la expansión en *C9ORF72* varía entre las series clínicas -entre un 9–27% de los pacientes- y la mayoría presentan un fenotipo de APP-vnf (Snowden et al., 2012; Mahoney et al., 2012). Uno de nuestros pacientes presentó agramatismo inicialmente aislado y a los seis meses se evidenciaron en la exploración signos de primera y segunda motoneurona, confirmándose el diagnóstico de ELA en el estudio neurofisiológico. Previamente, la presencia de APP-vnf, en el contexto de una ELA, con o sin DFT asociada, ha sido descrita (Lomen-Hoerth et al., 2002; Heidler-Gary et al., 2007). La otra paciente APP-vnf portadora de la expansión en *C9ORF72* desarrolló evolutivamente síntomas conductuales compatibles con DFT un año después de su inclusión en el estudio. El fenotipo clínico de DFT, con o sin ELA asociada, es el más frecuente en las mutaciones del *C9ORF72* y los estudios de neuroimagen grupal han mostrado una atrofia simétrica a nivel frontal y temporal, si bien se constata gran variabilidad a nivel individual (Boeve et al., 2012; Mahoney et al., 2012; Snowden et al., 2012). La neuroimagen de los dos pacientes de nuestro estudio fue calificada de inespecífica, bien por la ausencia de una atrofia focal o bien por la presencia de una atrofia cortical generalizada.

En nuestra cohorte el mayor porcentaje de portadores del *APOE* ϵ 4 se encontró en el grupo de APP-vl, al igual que en publicaciones previas (Gorno-Tempini et al., 2004). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grupos de APP, algo posiblemente relacionado con el tamaño muestral. Merece la pena destacar que más de la mitad de los sujetos con APP-vl no mostraron positividad para el *APOE* ϵ 4, sugiriendo, como en trabajos previos, que la frecuencia de los portadores del *APOE* ϵ 4 es menor en pacientes con un fenotipo clínico no amnésico de EA que en pacientes con EA y el clásico fenotipo clínico de pérdida de memoria episódica (Van der Flier et al., 2006).

Otro biomarcador que podría permitir un mayor conocimiento sobre la neurobiología de la APP es la determinación sérica de los niveles de progranulina. En el segundo trabajo se estudiaron los niveles séricos medios de progranulina en una cohorte retrospectiva de pacientes con diagnóstico clínico de DLFT (DFT, APNF y DS) y EA. En cinco pacientes se

detectaron niveles de progranulina sérica reducidos (< 94 ng/mL) identificándose en cuatro de ellos una mutación en *GRN* (tres mutaciones nulas y una mutación de patogenicidad incierta) y en el otro paciente una mutación en el gen de la proteína priónica (*PRNP*). Los niveles de progranulina sérica en los pacientes portadores de las mutaciones nulas de *GRN* mostraron una reducción de un tercio respecto a controles, en consonancia con la haploinsuficiencia de progranulina ocasionada por la mutación. Este hecho, apoya la utilidad diagnóstica de los niveles séricos de progranulina disminuidos como una buena herramienta de screening para detectar a portadores de mutaciones en *GRN*, incluso en la ausencia de una historia familiar. Una vez excluidos los sujetos con mutaciones en *GRN*, la cuantificación de los niveles séricos de progranulina no reveló diferencias estadísticas entre los grupos de pacientes estudiados.

El análisis de los fenotipos clínicos de los portadores de mutaciones en *GRN* presentados en el trabajo 2 evidencian, al igual que estudios previos, que la clínica asociada a las mutaciones en este gen es heterogénea (van Swieten et al., 2008). El fenotipo clínico de los tres pacientes portadores de las mutaciones nulas fue de DFT (en la mutación *p.V279GfsX5*) y de EA y APP-vnf (en la mutación *p.C366fsX1*). El paciente portador de la mutación de patogenicidad incierta (*p.C139R*) presentó inicialmente una APP-vnf. Esta mutación se había descrito previamente en cuatro pacientes independientes con fenotipos clínicos diversos (en dos casos DFT, en uno APP y en otro EA) y por el contrario, estuvo ausente en el estudio de 907 controles (Brouwers et al., 2008; Finch et al., 2009; Bernardi et al., 2009; Bagnoli et al., 2011). Nuestro paciente debutó clínicamente con una apraxia del habla aislada y evolutivamente desarrolló un deterioro cognitivo generalizado y un SPSP. El desarrollo clínico de parkinsonismo es frecuente en los portadores de mutaciones de *GRN* y se observa en un tercio de los pacientes durante la progresión de la enfermedad (Beck et al., 2008). Dos familiares asintomáticos del paciente fueron portadores de esta mutación y ambos mostraron niveles reducidos de progranulina en un rango similar al del paciente. Estos niveles fueron más bajos que los niveles séricos medios de esta proteína en controles pero más elevados que los detectados en otros portadores de mutaciones nulas de nuestra cohorte. Por el contrario, los niveles séricos de progranulina de otro miembro familiar, no portador de la mutación, fueron normales. Esta reducción más moderada de los niveles medios de progranulina sugiere que esta mutación no produce una pérdida total de la función de la proteína mutada, al contrario de los que ocurre en las mutaciones nulas de *GRN* (Sleegers et al., 2009). En nuestro paciente, el análisis de expresión génica mostró la presencia del alelo mutante en la misma proporción que el alelo wildtype, sugiriendo que la patogenicidad de la mutación *p.C139R* es incierta. Otros estudios apoyan, no obstante, su patogenicidad (Brouwers et al., 2008).

La afasia, con un fenotipo APP-vnf, fue la presentación clínica inicial de dos pacientes con mutaciones en *GRN* incluidos en el trabajo 1. Los estudios iniciales de APP asociada a mutaciones en *GRN* (APP-*GRN*) mostraban que el perfil de APP de estos pacientes cumplía habitualmente criterios de una APP-vnf (Beck et al., 2008). Sin embargo, el análisis prospectivo de las características del lenguaje de pacientes individuales portadores de mutaciones en *GRN*, ha mostrado que el fenotipo del lenguaje ligado a la APP-*GRN* presenta características mixtas, con rasgos intermedios entre diferentes variantes. El estudio neurolingüístico del grupo de Manchester de un portador de otra mutación en *GRN*, mostró inicialmente una severa anomia con posterior afectación de la comprensión de palabras aisladas, sugiriendo un fenotipo de APP-vs (Snowden et al., 2007b). Otra paciente con APP-*GRN* presentó inicialmente agramatismo al que se le asociaron evolutivamente, dificultad para la comprensión y la repetición de palabras aisladas y de frases, mostrando un fenotipo de APP mixto (Rohrer et al., 2008b). Las evaluaciones neuropsicológicas sucesivas mostraron, al igual que en nuestro caso de la mutación *p.C366fsX1*, un declinar progresivo del ítem de fluencia semántica. Además, con la progresión de la enfermedad, este paciente desarrolló acalculia y apraxia imitativa e ideomotora, signos clínicos consistentes con la típica afectación del lóbulo parietal de las mutaciones de *GRN* (Rohrer et al., 2008b). En este sentido, la afectación de la encrucijada temporo-parietal izquierda y de sus conexiones, ocasionó en otro paciente con APP-*GRN* descrito por el mismo grupo, un fenotipo del lenguaje similar a la APP-vl con algunos rasgos asociados también de APP-vnf (Rohrer et al., 2010c). A la luz de estas descripciones, la pregunta sin resolver en la APP-*GRN*, continua siendo si esta entidad constituye un síndrome de APP independiente o es una continuación sindrómica más evolucionada de la APP-vnf pero con un sustrato patológico distinto. Solamente la realización de futuros análisis grupales e individuales detallados podrá definir mejor el fenotipo de APP-*GRN* así como ampliar el conocimiento de sus correlaciones clínico-genéticas y clínico-patológicas.

Los trabajos previos sugieren que en la práctica clínica, disponemos de buenos marcadores de neuroimagen, bioquímicos y genéticos, para identificar pacientes con la APP-vs -asociada habitualmente a neuropatología DLFT-TDP43- la APP-vl o la APP-i -asociadas a neuropatología de EA- y la APP asociada a mutaciones en *GRN*. Sin embargo, la APP-vnf presenta una peor caracterización a través de biomarcadores y tampoco se dispone actualmente de marcadores de predicción de neuropatología DLFT-tau, que es la más frecuentemente asociada a esta variante. Estudios previos señalan que el desarrollo de síndromes parkinsonianos atípicos en la APP-vnf se asocia de forma consistente a neuropatología DLFT-tau. Sin embargo, la aparición de estos signos clínicos puede resultar tardía, especialmente si se pretende actuar de forma precoz sobre la enfermedad subyacente.

En este sentido, en el tercer trabajo de la presente tesis, se planteó la exploración *in vivo* de la vía nigroestriatal, típicamente alterada en los síndromes parkinsonismos degenerativos, mediante ^{123}I -FP-CIT-SPECT en pacientes APP-vnf que no presentaban todavía síntomas parkinsonianos. Los resultados del trabajo 3 muestran como los pacientes APP-vnf sin parkinsonismo clínico inicial, presentaron una disminución significativa del trazador respecto a controles, tanto en la inspección visual del ^{123}I -FP-CIT SPECT como a nivel semi-cuantitativo. La reducción en la captación estriatal del ^{123}I -FP-CIT en el grupo APP-vnf sin parkinsonismo clínico se interpreta como un biomarcador de neurodegeneración subclínica nigroestriatal en estos pacientes. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la captación estriatal del trazador en los pacientes APP-vl, lo cual sugiere que la degeneración nigroestriatal detectada en la APP-vnf no es atribuible a una pérdida global de sustancia gris y que es específica de la APP-vnf.

En una segunda aproximación diagnóstica, con el objetivo de intentar “aislar” en el grupo de APP-vnf a sujetos cuyo sustrato neuropatológico más probable fuera una DLFT-tau, se analizaron los resultados del ^{123}I -FP-CIT-SPECT teniendo en cuenta la cuantificación de biomarcadores de EA en LCR y excluyendo a pacientes portadores de mutaciones de *GRN*. La reducción de la captación estriatal del trazador se mostró, en este análisis, más significativa en el grupo APP-vnf/bio- respecto a controles. Además, las diferencias entre el grupo APP-vnf/bio- y APP-vl/EA fueron estadísticamente significativas, sugiriendo que la cuantificación *in vivo* de los biomarcadores disponibles ayudó a homogeneizar los grupos clínicos y que los biomarcadores ayudaron a predecir, con mayor precisión, un patrón anormal de captación en el SPECT con ^{123}I -FP-CIT a partir del diagnóstico clínico.

Aunque nuestro estudio es el primero publicado hasta la fecha valorando el estado de la vía nigroestriatal *in vivo* en pacientes con APP-nvf, existe un estudio previo de Rinne y colaboradores que evaluó, mediante PET, la presencia de degeneración nigroestriatal en doce pacientes con diagnóstico clínico de DFT usando un análogo de la cocaína, el 2- β -Carbometoxi-3- β -(4-fluorofenil)tropano o [11C]CFT, como ligando del transportador de dopamina pre-sináptico de las neuronas nigroestriatales (Rinne et al., 2002). En el estudio se vio que la captación del trazador estaba reducida, de forma bilateral, en el núcleo caudado y putamen en los pacientes con DFT. Sin embargo, en este estudio, todos los pacientes mostraban algún tipo de signos extrapiramidales en el momento de la inclusión, como queda reflejado en las puntuaciones de la subescala motora de la UPDRS. Además, no se realizaron análisis genéticos, para detectar, por ejemplo, a sujetos con mutaciones en el gen *MAPT*, que frecuentemente de asocia a DFT con parkinsonismo (Sieben et al., 2012). Los resultados de la captación del ligando de dopamina en este estudio fueron muy

heterogéneos a nivel individual, algo que podría estar relacionado con los diferentes sustratos neuropatológicos que presenta la DFT o con la severidad de los síntomas extrapiramidales que presentaban los pacientes.

El índice de asimetría estriatal en la APP-vnf fue menor que en los controles, indicando una mayor afectación en el ^{123}I -FP-CIT SPECT en el estriado izquierdo. Este hecho puede atribuirse a la distribución del daño anatómico, preferentemente izquierdo, de los circuitos fronto-estriatales en la APP-vnf (Josephs et al., 2006a). En nuestro estudio la ratio caudado/putamen izquierda en el grupo de APP-vnf también se vio reducida respecto a controles, indicando una mayor disminución de la recaptación del trazador en el núcleo caudado que en el putamen. Esta ratio se encuentra reducida de forma similar en la PSP/DCB, confirmando, de acuerdo a la neuropatología de ambas, una mayor y más temprana pérdida de los receptores del transportador de dopamina en las regiones del caudado anterior en estas entidades (Dickson et al., 2002; Filippi et al., 2006; Murphy et al., 2008; Kagi et al., 2010). Por el contrario, en la enfermedad de Parkinson idiopática, la reducción de la captación del trazador es más pronunciada en la parte posterior del putamen, también en concordancia con la neuropatología de la enfermedad (Braak et al., 2003; Oh et al., 2012). En los pacientes con DFT, por el contrario, la recaptación dopaminérgica estriatal está reducida de forma similar en el caudado y en el putamen (Rinne et al., 2002).

El diseño original del estudio 3 fue transversal, sin embargo, en el momento del cierre del estudio se disponía ya de datos de seguimiento longitudinales de interés. Así, el 70% de los pacientes con APP-vnf había desarrollado signos extrapiramidales característicos de síndromes parkinsonianos atípicos. La mayoría de estos pacientes (85%) ya presentaban, en el momento de su evaluación inicial e inclusión en el estudio, una recaptación dopaminérgica estriatal de ^{123}I -FP-CIT patológica. En la misma línea, todos los pacientes que presentaron una ratio alterada de la recaptación del ^{123}I -FP-CIT en ambos estriados y que han tenido un seguimiento más prolongado, han desarrollado signos clínicos de parkinsonismo. Por el contrario, ninguno de los pacientes con APP-vl ha desarrollado parkinsonismo clínico durante el seguimiento. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la reducción de la recaptación dopaminérgica estriatal del ^{123}I -FP-CIT podría predecir la evolución hacia un síndrome parkinsoniano en los pacientes con APP, posiblemente relacionado con una DLFT-tau subyacente. La principal limitación de nuestro estudio es la ausencia de confirmación neuropatológica. El estudio postmortem sería valiosamente informativo para apoyar la asociación de la APP-vnf con alteración estriatal en el ^{123}I -FP-CIT SPECT, con un sustrato de DLFT-tau.

Otros grupos de investigación están asimismo realizando una búsqueda activa de marcadores específicos de patología DLFT-tau. Entre ellos destacan: a) nuevos ligandos de PET, como el radiotrazador ^{18}F -THK523, que ha mostrado una alta afinidad y selectividad por la patología de tau hiperfosforilada de los ovillos neurofibrilares tanto *in vitro* como *in vivo*, cumpliendo criterios de ligando apto para usarse en ensayos clínicos en humanos (Fodero-Tavoletti et al., 2011) y b) estudios de conectividad mediante tensor de difusión en RM, que han identificado un patrón de afectación característico en un pequeño grupo de sujetos con APP-nvf sin parkinsonismo clínico inicial que evolucionaron hacia un SCB/SPSP en el seguimiento longitudinal a un año (Sajjadi et al., 2013). En futuros trabajos sería interesante poder disponer de estudios comparativos entre los distintos marcadores en una misma muestra.

Si bien las limitaciones de los trabajos que componen esta tesis doctoral se discuten en cada uno de ellos, hemos de reconocer dos principales limitaciones comunes a todos ellos: el limitado tamaño muestral de las series y la ausencia de datos neuropatológicos que permitan realizar una correlación clínico-paraclínico-patológica. La primera limitación es inevitable al enfocar el estudio en una enfermedad de baja frecuencia y que creemos sólo podría ser resuelta con la planificación de un estudio multicéntrico. Respecto a la segunda limitación, es la intención de los investigadores completar, en la medida de lo posible, el seguimiento evolutivo de los participantes en todos estos estudios.

En resumen, la rica fenomenología de la APP y las diferentes enfermedades neurodegenerativas que pueden presentarse clínicamente con un síndrome de APP, representa un indudable reto diagnóstico para el clínico. La búsqueda de nuevas terapias que puedan modificar el curso evolutivo de las enfermedades neurodegenerativas, obliga a los clínicos a realizar un diagnóstico precoz y a investigar el posible sustrato molecular subyacente. Por este motivo, el futuro de la APP pasa por la investigación e introducción en la clínica de diversos marcadores biológicos (bioquímicos, genéticos y nuevos marcadores de neuroimagen) que complementen la evaluación clínica y paraclínica disponible actualmente, tanto de las tres variantes más frecuentes de APP como de los casos clasificables. En este sentido, los trabajos de la presente monografía avalan el estudio *in vivo* de marcadores de neuroimagen estructural y funcional para la caracterización de las diferentes variantes clínicas de APP, los marcadores bioquímicos en LCR para diferenciar los casos de APP asociados a EA de los que presentan otro sustrato neuropatológicos, así como la utilidad clínica de la determinación de los niveles séricos de progranulina en sujetos con APP para detectar mutaciones en *GRN*. Finalmente, el ^{123}I -FP-CIT SPECT se postula como una potencial herramienta de detección subclínica nigroestriatal en los pacientes con APP-nvf.

VIII. Conclusiones

1. La mayoría de los casos de afasia primaria progresiva se pueden subclasificar en alguna de las tres variantes clínicas según los criterios actuales; sin embargo, existe un 15,6% de casos que resultan inclasificables. Hay una buena correlación entre los criterios clínicos y de neuroimagen, principalmente en las variantes logopénica y semántica de la afasia primaria progresiva. Los hallazgos de neuroimagen clínica en la variante no fluente/agramatical, son más heterogéneos. Los marcadores bioquímicos y genéticos permiten diferenciar los casos de afasia primaria progresiva con un substrato neuropatológico de degeneración lobular frontotemporal de aquellos con un substrato de enfermedad de Alzheimer, especialmente en los casos inclasificables clínicamente.

2. No existen diferencias en los niveles séricos de progranulina a nivel grupal entre pacientes con afasia primaria progresiva, demencia frontotemporal y enfermedad de Alzheimer, una vez excluidos los casos con mutaciones en el gen *GRN*. Los niveles séricos de progranulina son una buena herramienta de cribado de mutaciones en este gen, dado que su disminución nos permite identificar a portadores de mutaciones en *GRN*. Los portadores de mutaciones en el gen *GRN* presentan fenotipos clínicos heterogéneos, incluyendo casos con afasia primaria progresiva.

3. Los pacientes con la variante no fluente/agramatical de la afasia primaria progresiva, especialmente aquellos con un perfil bioquímico en líquido cefalorraquídeo no sugestivo de enfermedad de Alzheimer, presentan una alteración precoz de la vía nigroestriatal objetivada mediante el SPECT con $^{123}\text{I}^{\text{FP}}\text{-CIT}$, algo que no ocurre en los pacientes con la variante logopénica. Esta técnica apoya la existencia de degeneración subclínica nigroestriatal en estos sujetos, posiblemente relacionada con una neuropatología subyacente de degeneración lobar frontotemporal-tau y podría permitir identificar a los pacientes con afasia primaria progresiva con riesgo de desarrollar un parkinsonismo atípico.

IX. Bibliografía

Armstrong MJ, Litvan I, Lang A, et al. Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology* 2013;80:496-503.

Alladi S, Xuereb J, Bak T, et al. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. *Brain* 2007;130:2636-2645.

Alzheimer A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift for Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medicin* 1907;64:146-148.

Bagnoli S, Piaceri I, Tedde A, et al. Progranulin genetic screening in frontotemporal lobar degeneration patients from central Italy. *Cell Mol Neurobiol* 2011;32:13-16.

Bak TH, Hodges JR. Kissing and dancing -a test to distinguish the lexical and conceptual contributions to noun/verb and action/object dissociation. Preliminary results in patients with frontotemporal dementia. *J Neurolinguistics* 2003;16:169-181.

Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:663-672.

Banks S, Rogalski E, Medina J. Organizing a series of education and support conferences for caregivers of individuals with frontotemporal dementia and primary progressive aphasia. *Alzheimers Care Q* 2006;7:243-250.

Basso A, Capitani E, Laiacona M. Progressive language impairment without dementia: a case with isolated category specific semantic defect. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:1201-1207.

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.

Benamer HT, Patterson J, Wyper DJ, Hadley DM, Macphee GJ, Grosset DG. Correlation of Parkinson's disease severity and duration with 123I-FP-CIT SPECT striatal uptake. *Mov Disord* 2000;15:692-698.

Bernardi L, Maletta RG, Tomaino C, et al. The effects of APOE and tau gene variability on risk of frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* 2006;27:702-709.

Bernardi L, Tomaino C, Anfossi M, et al. Novel PSEN1 and PGRN mutations in early-onset familial frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* 2009;30:1825-1833.

Bian H, Van Swieten JC, Leight S, et al. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology* 2008;70:1827-1835.

Bird H, Lambon Ralph MA, Patterson K, Hodges JR. The rise and fall of frequency and imageability: Noun and verb production in semantic dementia. *Brain and Language* 2000;73:1-49.

Blennow K., Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003;2:605-613.

Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, et al. Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain* 2012;135:765-783.

Borkowski JG, Benton AL, Speen O. Word fluency and brain damage. *Neuropsychologia* 1967;5:135-140.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.

Broussolle E, Bakchine S, Tommasi M, et al. Slowly progressive anarthria with late anterior opercular syndrome: a variant form of frontal cortical atrophy syndromes. *J Neurol Sci* 1996;144:44-58.

Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S, et al. Genetic variability in progranulin contributes to risk for clinically diagnosed Alzheimer disease. *Neurology* 2008;71:656-664.

Cabeza R, Nyberg L. Imaging cognition II: An empirical review of 275 PET and fMRI studies. *Journal of Cognitive Neuroscience* 2000;12:1-47.

Caine D, Breen N, Patterson K. Emergence and progression of 'non-semantic' deficits in semantic dementia. *Cortex* 2009;45:483-494.

Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: Consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 2007;114:5-22.

Cerami C, Scarpini E, Cappa SF, Galimberti D. Frontotemporal lobar degeneration: current knowledge and future challenges. *J Neurol* 2012;259:2278-2286.

Clark DG, Charuvastra A, Miller BL, Shapira JS, Mendez MF. Fluent versus nonfluent primary progressive aphasia: a comparison of clinical and functional

neuroimaging features. *Brain Lang* 2005;94:54-60.

Cohen L, Benoit N, Van Eeckhout P, et al. Pure progressive aphemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:923-924.

Cohn-Hokke PE, Elting MW, Pijnenburg YA, et al. Genetics of dementia: Update and guidelines for the clinician. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012;159:628-643.

Costello AL, Warrington EK. Dynamic aphasia: the selective impairment of verbal planning. *Cortex* 1989;25:103-114.

Davies RR, Hodges JR, Kril JJ, et al. The pathological basis of semantic dementia. *Brain* 2005;128:1984-1995.

Dejerine J, Sérioux P. Un cas de surdité verbale pure terminée par aphasie sensorielle, suivie d'autopsie. *CR Acad Sci* 1897;49:1074-1077.

Delazer M, Semenza C, Reiner M, Hofer R, Benke T. Anomia for people names in DAT- evidence for semantic and post-semantic impairments. *Neuropsychologia* 2003;41:1593-1598.

Deramecourt V, Lebert F, Debachy B, et al. Prediction of pathology in primary progressive language and speech disorders. *Neurology* 2010;74:42-49.

Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, et al. Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:935-946.

Dickson DW, Kouri N, Murray ME, et al. Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-Tau (FTLD-Tau). *J Mol Neurosci* 2011;45:384-389.

Diehl J, Grimmer T, Drzezga A, Riemenschneider M, Forstl H, Kurz A. Cerebral metabolic patterns at early stages of frontotemporal dementia and semantic dementia. A PET study. *Neurobiol Aging* 2004;25:1051-1056.

Duffy J. Apraxia of speech in degenerative neurologic disease. *Aphasiology* 2006;20: 511-527.

Duffy JR, Josephs KA. The diagnosis and understanding of apraxia of speech: why including neurodegenerative etiologies may be important. *J Speech Lang Hear Res* 2012;55:518-522.

Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A₄₂ in humans. *Ann Neurol* 2006;59:512-519.

Filippi L, Manni C, Pierantozzi M, et al. 123I-FP-CIT in progressive supranuclear palsy and in Parkinson's disease: a SPECT semiquantitative study. *Nucl Med Commun* 2006;27:381-386.

Finch N, Baker M, Crook R, et al. Plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain* 2009;132:583-581.

Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, et al. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* 2011;134:1089-1100.

Forman MS, Farmer J, Johnson JK, et al. Frontotemporal dementia: clinicopathological correlations. *Ann. Neurol* 2006;59:952-962.

Caso F, Gesierich B, Henry M, et al. Nonfluent/agrammatic PPA with in-vivo cortical amyloidosis and Pick's disease pathology. *Behav Neurol* 2013;26:95-106.

Franceschi F. Gliosi perivascolare in un caso di demenza afasica. *Annali di Neurologia* 1908;26:281-290.

Galton CJ, Patterson K, Graham K, et al. Differing patterns of temporal atrophy in Alzheimer's disease and semantic dementia. *Neurology* 2001;57:216-225.

Gallassi R, Sambati L, Poda R, et al. Slowly progressive aphemia: a neuropsychological, conventional, and functional MRI study. *Neurol Sci* 2011;32:1179-1186.

Geschwind D, Karrim J, Nelson SF, Miller B. The apolipoprotein E epsilon4 allele is not a significant risk factor for frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998;44:134-138.

Goldman JS. New approaches to genetic counseling and testing for Alzheimer's disease and frontotemporal degeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12:502-510.

Goldman JS, Rademakers R, Huey ED, et al. An algorithm for genetic testing of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2011;76:475-483.

Goodglass H, Kaplan E. Evaluación de la afasia y de otros trastornos relacionados. 2ª ed (JE García-Albea, ML Sánchez-Bernardos and S del Viso, versión). Madrid: Editorial Médica Panamericana 1996.

Goodglass H, Kaplan EF. The Boston Diagnostic Aphasia Examination. Philadelphia: Lea &Febiger 1983.

- Goodglass H, Quadfasel FA, Timberlake WH. Phrase length and the type of severity of aphasia. *Cortex* 1964; 1:133-153.
- Gorno-Tempini ML, Brambati SM, Ginex V, et al. The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia. *Neurology* 2008;7:1227-1234.
- Gorno-Tempini ML, Dronkers NF, Rankin KP, et al. Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2004; 55: 335-346.
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011;76:1006-1014.
- Greene JD, Patterson K, Xuereb J, Hodges JR. Alzheimer disease and nonfluent progressive aphasia. *Arch Neurol* 1996;53:1072-1078.
- Grossman M, Farmer J, Leight S, et al. Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005;57:721-729.
- Grossman M, Mickanin J, Onishi K, et al. Progressive non-fluent aphasia: Language, cognitive and PET measures contrasted with probable Alzheimer's disease. *Journal of Cognitive Neuroscience* 1996;8:135-154.
- Grossman M, Xie SX, Libon DJ, et al. Longitudinal decline in autopsy-defined frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2008;70:2036-2045.
- Grossman M. Primary progressive aphasia: clinicopathological correlations. *Nat Rev Neurol* 2010;6:88-97.
- Grossman M. The non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia. *Lancet Neurol* 2012;11:545-555.
- Harciarek M, Kertesz A. Primary progressive aphasias and their contribution to the contemporary knowledge about the brain-language relationship. *Neuropsychol Rev* 2011;21:271-287.
- Heidler-Gary J, Hillis AE. Distinctions between the dementia in amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia and the dementia of Alzheimer's disease. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8:276-82.
- Herholz K, Ebmeier K. Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2011;10:667-670.
- Hillis AE, Tuffiash E, Caramazza A. Modality-specific deterioration in naming verbs in nonfluent primary progressive aphasia. *J Cogn Neurosci* 2002;14:1099-1108.

Hillis AE. Aphasia: progress in the last quarter of a century. *Neurology* 2007;69:200-213.

Hodges JR, Davies R, Xuereb J, Kril JJ, Halliday GM. Survival in frontotemporal dementia. *Neurology* 2003; 61:349-354.

Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, et al. Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2004;56:399-406.

Hodges JR, Mitchell J, Dawson K, et al. Semantic dementia: demography, familial factors and survival in a consecutive series of 100 cases. *Brain* 2010;133:300-306.

Hodges JR, Patterson K, Oxbury S, et al. Semantic dementia: Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain* 1992;115:1783-1806.

Hodges JR, Patterson K. Nonfluent progressive aphasia and semantic dementia: a comparative neuropsychological study. *J Int Neuropsychol Soc* 1996;2:511-524.

Hodges JR. Alzheimer's disease and the frontotemporal dementias: contributions to clinico-pathological studies, diagnosis and cognitive neuroscience. *J Alzheimers Dis* 2012;33:1-7.

Howard D, Patterson K. *Pyramids and Palm trees: a test of semantic access from pictures and words*. Bury St Edmunds, Suffolk, United Kingdom: Thames Valley Publishing Company 1992.

Hu WT, McMillan C, Libon D, et al. Multimodal predictors for Alzheimer disease in nonfluent primary progressive aphasia. *Neurology* 2010;75:595-602.

Ikejima C, Yasuno F, Mizukami K, et al. Prevalence and causes of early onset dementia in Japan: A population based study. *Stroke* 2009;40:2709-2714.

Iranzo A, Valldeoriola F, Lomena F, et al. Serial dopamine transporter imaging of nigrostriatal function in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study. *Lancet Neurol* 2011;10:797-805.

Johnson JK, Diehl J, Mendez MF, et al. Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Arch Neurol* 2005;62:925-930.

Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, et al. Characterizing a neurodegenerative syndrome: primary progressive apraxia of speech. *Brain* 2012;135:1522-1536.

Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, et al. Clinicopathologic analysis of frontotemporal and corticobasal degenerations and PSP. *Neurology* 2006b;66:41-48.

Josephs KA, Duffy JR, Strand EA, et al. Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. *Brain* 2006a;129:1385-1398.

Josephs KA, Knopman DS, Whitwell JL, et al. Survival in two variants of tau-negative frontotemporal lobar degeneration: FTL-D vs FTL-D-MND. *Neurology* 2005;65:645-647.

Josephs KA, Whitwell JL, Duffy JR, et al. Progressive aphasia secondary to Alzheimer disease vs FTL-D pathology. *Neurology* 2008;70:25-34.

Kagi G, Bhatia KP, Tolosa E. The role of DAT-SPECT in movement disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:5-12.

Kapaki E, Paraskevas GP, Papageorgiou SG, et al. Diagnostic value of CSF biomarker profile in frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2008;22:47-53.

Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S. The Boston Naming Test, experimental edition. *Boston Naming Test, 2nd ed.* Philadelphia: Lippincott Williams 2001.

Kertesz A, Davidson W, McCabe P, et al. Primary progressive aphasia: diagnosis, varieties, evolution. *J Int Neuropsychol Soc* 2003;9:710 -719.

Kertesz A, Jesso S, Harciarek M, Blair M, McMonagle P. What is semantic dementia?: a cohort study of diagnostic features and clinical boundaries. *Arch Neurol* 2010;67:483-489.

Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Munoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain* 2005;128:1996-2005.

Klaffke S, Kuhn AA, Plotkin M, et al. Dopamine transporters, D2 receptors, and glucose metabolism in corticobasal degeneration. *Mov Disord* 2006;21:1724-1727.

Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound B. *Ann Neurol* 2004;55:306-319.

Knibb JA, Xuereb JH, Patterson K, Hodges JR: Clinical and pathological characterization of progressive aphasia. *Ann Neurol* 2006;59:156-165.

Knopman DS, Petersen RC, Edland SD, Cha RH, Rocca W A. The incidence of frontotemporal lobar degeneration in Rochester, Minnesota, 1990 through 1994. *Neurology* 2004;62:506-508.

Le Ber I, Camuzat A, Guillot-Noel L, et al. C9ORF72 repeat expansions in the frontotemporal dementia spectrum of diseases: a flow-chart for genetic testing. *J Alzheimers Dis* 2013;34:485-499.

Le Rhun E, Richard F, Pasquier F. Natural history of primary progressive aphasia. *Neurology* 2005;65:887-891.

Leyton CE, Villemagne VL, Savage S, et al. Subtypes of progressive aphasia: application of the International Consensus Criteria and validation using beta-amyloid imaging. *Brain* 2011;134:3030-3043.

Libon DJ, Xie S, Wang X, et al. Neuropsychological decline in frontotemporal lobar degeneration: a longitudinal analysis. *Neuropsychology* 2008;23:337-346.

Libon DJ, Xie SX, Moore P, et al. Patterns of neuropsychological impairment in frontotemporal dementia. *Neurology* 2007; 68:369-375.

Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller BL. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 2002; 59:1077-1079.

Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, et al. A harmonized classification system for FTL-D-TDP pathology. *Acta Neuropathol* 2011;122:111-113.

Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, et al. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol* 2010;119:1-4

Mackenzie IR, Shi J, Shaw CL, et al. Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta Neuropathol* 2006;112:551-559.

Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, et al. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012;135:736-750.

Marra C, Bizzarro A, Daniele A, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele differently affects the patterns of neuropsychological presentation in early- and late-onset Alzheimer's disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004;18:125-131.

McKeith I, O'Brien J, Walker Z, et al. Sensitivity and specificity of dopamine

transporter imaging with 123I-FP-CIT SPECT in dementia with Lewy bodies: a phase III, multicentre study. *Lancet Neurol* 2007;6:305-313.

Medina J, Weintraub S. Depression in primary progressive aphasia. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2007;20:153-160.

Mehta PD, Pirttila T, Mehta SP, et al. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1–40 and 1–42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2000;57:100-105.

Mercy L, Hodges JR, Dawson K, Barker RA, Brayne C. Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology* 2008;71:1496-1499.

Mesulam M, Johnson N, Krefft TA, et al. Progranulin mutations in primary progressive aphasia: the PPA1 and PPA3 families. *Arch Neurol* 2007;64:43-47.

Mesulam M, Wicklund A, Johnson N, et al. Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2008; 63:709-719.

Mesulam M, Wieneke C, Rogalski E, Cobia D, Thompson C, Weintraub S. Quantitative template for subtyping primary progressive aphasia. *Arch Neurol* 2009;66:1545-1551.

Mesulam M, Wieneke C, Thompson C, Rogalski E, Weintraub S. Quantitative classification of primary progressive aphasia at early and mild impairment stages. *Brain* 2012;135:1537-1553.

Mesulam MM. Primary progressive aphasia. A 25-year retrospective. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2007;21:8-11.

Mesulam MM. Primary progressive aphasia. *Annals of Neurology* 2001;49:425-432.

Mesulam MM. Primary progressive aphasia: a language based dementia. *N Engl J Med* 2003;349:1535-1542.

Mesulam MM. Primary progressive aphasia-differentiation from Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1987;22: 533-534.

Mesulam MM. Slowly progressive aphasia without generalized dementia. *Ann Neurol* 1982;11:592–598.

Mingazzini G. On aphasia due to atrophy of the cerebral convolutions. *Brain* 1914; 36:493-524.

- Molinuevo JL, Gómez-Anson B, Monte GC, Bosch B, Sánchez-Valle R, Rami L. Neuropsychological profile of prodromal Alzheimer's disease (Prd-AD) and their radiological correlates. *Arch Gerontol Geriatr* 2011;52:190-196.
- Mummery C, Patterson K, Price C, et al. A voxel-based morphometry study of semantic dementia: relationship between temporal lobe atrophy and semantic memory. *Ann Neurol* 2000;47:36-45.
- Murphy KE, Karaconji T, Hardman CD, Halliday GM. Excessive dopamine neuron loss in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2008;23:607-610.
- Murray R, Neumann M, Forman MS, et al. Cognitive and motor assessment in autopsy-proven corticobasal degeneration. *Neurology* 2007;68:1274-1283.
- Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998;51:1546-1554.
- Nestor PJ, Balan K, Cheow HK, et al. Nuclear imaging can predict pathologic diagnosis in progressive nonfluent aphasia. *Neurology* 2007;68:238-239.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-133.
- Ogar J, Slama H, Dronkers N, et al. Apraxia of speech: an overview. *Neurocase* 2005;11:427-432.
- Ogar JM, Dronkers NF, Brambati SM, Miller BL, Gorno-Tempini ML. Progressive nonfluent aphasia and its characteristic motor speech deficits. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2007;21:23-30.
- Oh M, Kim JS, Kim JY, et al. Subregional patterns of preferential striatal dopamine transporter loss differ in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and multiple-system atrophy. *J Nucl Med* 2012;53:399-406.
- Paraskevas GP, Kapaki E, Liappas I, et al. The diagnostic value of cerebrospinal fluid tau protein in dementing and nondementing neuropsychiatric disorders. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2005;18:163-173.
- Pellecchia MT, Varrone A, Annesi G, et al. Parkinsonism and essential tremor in a family with pseudo-dominant inheritance of PARK2: an FP-CIT SPECT study. *Mov Disord* 2007;22:559-563.
- Perez DL, Dickerson BC, McGinnis SM, et al. You don't say: dynamic aphasia, another variant of primary progressive aphasia? *J Alzheimers Dis* 2013;34:139-144.

- Pick A. Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zue Aphasie. Prager Medicinische Wochenschrift 1892;17:165-67.
- Pirker W, Djamshidian S, Asenbaum S, et al. Progression of dopaminergic degeneration in Parkinson's disease and atypical parkinsonism: a longitudinal beta-CIT SPECT study. *Mov Disord* 2002;17:45-53.
- Poeck K, Luzzatti C. Slowly progressive aphasia in three patients. The problem of accompanying neuropsychological deficit. *Brain* 1988;111:151-168.
- Rabinovici GD, Furst AJ, O'Neil JP, et al. 11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2007;68:1205-1212.
- Rabinovici GD, Jagust WJ, Furst AJ, et al. Abeta amyloid and glucose metabolism in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2008;64:388-401.
- Rademakers R, Cruts M, van Broeckhoven C. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum Mutat* 2004;24:277-295.
- Rascovsky K, Salmon DP, Lipton AM, et al. Rate of progression differs in frontotemporal dementia and Alzheimer disease. *Neurology* 2005;65:397-403.
- Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 2002;58:1615-1621.
- Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Diehl J, et al. Tau and A_β 42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration. *Neurology* 2002;58:1622-1628.
- Rinne JO, Laine M, Kaasinen V, et al. Striatal dopamine transporter and extrapyramidal symptoms in frontotemporal dementia. *Neurology* 2002;58:1489-1493.
- Roberson ED, Hesse JH, Rose KD, et al. Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology* 2005;65:719-725.
- Robinson G, Cipolotti L. The selective preservation of colour naming in semantic dementia. *Neurocase* 2001;7:65-75.
- Rogalski E, Cobia D, Harrison TM, Wieneke C, Weintraub S, Mesulam MM. Progression of language decline and cortical atrophy in subtypes of primary progressive aphasia. *Neurology* 2011;76:1804-1810.
- Rogalski E, Rademaker A, Weintraub S. Primary progressive aphasia: relationship between gender and severity of language impairment. *Cogn Behav Neurol* 2007;20:38-43.

Rogalski EJ, Mesulam MM. Clinical trajectories and biological features of primary progressive aphasia (PPA). *Curr Alzheimer Res* 2009;6:331-336.

Rohrer JD, Crutch SJ, Warrington EK, Warren JD. Progranulin-associated primary progressive aphasia: A distinct phenotype? *Neuropsychologia* 2010c;48:288-297.

Rohrer JD, Knight WD, Warren JE, et al. Word-finding difficulty: a clinical analysis of the progressive aphasia. *Brain* 2008a;131:8-38.

Rohrer JD, Paviour D, Bronstein AM, O'Sullivan SS, Lees A, Warren JD. Progressive supranuclear palsy syndrome presenting as progressive nonfluent aphasia: a neuropsychological and neuroimaging analysis. *Mov Disord* 2010a;25:179-188.

Rohrer JD, Ridgway GR, Crutch SJ, et al. Progressive logopenic/phonological aphasia: Erosion of the language network. *Neuroimage* 2010d;49:984-933.

Rohrer JD, Rossor MN, Warren JD. Syndromes of nonfluent primary progressive aphasia: a clinical and neurolinguistic analysis. *Neurology* 2010b;75: 603-610.

Rohrer JD, Rossor MN, Warren JD. Alzheimer's pathology in primary progressive aphasia. *Neurobiol Aging* 2012;33:744-752.

Rohrer JD, Warren JD, Barnes J, et al. Mapping the progression of progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Nat Clin Pract Neurol* 2008b;4:455-460.

Rohrer JD, Warren JD, Modat M, et al. Patterns of cortical thinning in the language variants of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2009;72:1562-1569.

Rosen HJ, Allison SC, Ogar JM, et al. Behavioral features in semantic dementia vs other forms of progressive aphasia. *Neurology* 2006;67:1752-1756.

Rosenfield DB, Bogatka CJ, Viswanath NS, et al. Speech apraxia in cortical-basal ganglionic degeneration. *Ann Neurol* 1991;30:296-297.

Rosso SM, Landweer EJ, Houterman M, et al. Medical and environmental risk factors for sporadic frontotemporal dementia: a retrospective case-control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1574-1576.

Sajjadi SA, Acosta-Cabrero J, Patterson K, Diaz-de-Greñu LZ, Williams GB, Nestor PJ. Diffusion tensor magnetic resonance imaging for single subject diagnosis in neurodegenerative diseases. *Brain*.2013;136:2253-2261.

- Sajjadi SA, Patterson K, Arnold RJ, Watson PC, Nestor PJ. Primary progressive aphasia: a tale of two syndromes and the rest. *Neurology* 2012;78:1670-1677.
- Sánchez-Valle R, Forman MS, Miller BL, Gorno-Tempini ML. From progressive nonfluent aphasia to corticobasal syndrome: a case report of corticobasal degeneration. *Neurocase* 2006;12:355-359.
- Sapolsky D, Bakkour A, Negreira A, et al. Cortical neuroanatomic correlates of symptom severity in primary progressive aphasia. *Neurology* 2010;75:358-366.
- Schofield EC, Halliday GM, Kwok J, Loy C, Double KL, Hodges JR. Low serum progranulin predicts the presence of mutations: A prospective study. *J Alzheimers Dis* 2010;22:981-984.
- Schoonenboom NS, Pijnenburg YA, Mulder C, et al. Amyloid beta(1-42) and phosphorylated tau in CSF as markers for early-onset Alzheimer disease. *Neurology* 2004;62:1580-1584.
- Sérieux P. Sur un cas de surdité verbale pure. *Rev Med* 1893;13:733-750.
- Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, et al. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol* 2009;65: 403-413.
- Short RA, Graff-Radford NR, Adamson J, Baker M, Hutton M. Differences in tau and apolipoprotein E polymorphism frequencies in sporadic frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Arch Neurol* 2002;59:611-615.
- Sieben A, Van Langenhove T, Engelborghs S, et al. The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 2012;124:353-372.
- Silveri MC, Cappa A, Salvigni BL. Speech and language in primary progressive anarthria. *Neurocase* 2003;9:213-220.
- Sjögren M, Minthon L, Davidson P, et al. CSF levels of tau, -amyloid 1-42 and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. *J Neural Transm* 2000;107:563-579.
- Sleegers K, Brouwers N, Van Damme P, et al. Serum biomarker for progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol* 2009;65:603-609.
- Slooter AJ, Cruts M, Kalmijn S, et al. Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 1998;55:964-968.

Snowden J, Neary D, Mann D. Frontotemporal degeneration: clinical and pathological relationships. *Acta Neuropathol* 2007a;114:31-38.

Snowden JS, Goulding P, Neary D. Semantic dementia: a form of circumscribed cerebral atrophy. *Behav Neurol* 1989;2:167-182

Snowden JS, Pickering-Brown SM, Du Plessis D, et al. Progressive anomia revisited: focal degeneration associated with progranulin gene mutation. *Neurocase* 2007b;13:366-377.

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.

Snowden JS, Rollinson S, Thompson JC, et al. Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations. *Brain* 2012;135:693-708.

Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF A β 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 2003;60:652-656.

Tapiola T, Overmyer M, Lehtovirta M, et al. The level of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997;8:3961-3963.

Van der Flier WM, Schooneboom SNM, Pijnenburg YAL, Fox NC, Scheltens P. The effect of APOE genotype on clinical phenotype in Alzheimer's disease. *Neurology* 2006;67:526-527.

van Swieten J, Spillantini MG. Hereditary frontotemporal dementia caused by tau gene mutations. *Brain Pathol* 2007;17:63-73.

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.

Warrington EK. The selective impairment of semantic memory. *Q J Exp Psychol* 1975;27:635-657.

Weintraub S, Rubin NP, Mesulam MM. Primary progressive aphasia. Longitudinal course, neuropsychological profile, and language features. *Arch Neurol* 1990;47:1329-1335.

Welge V, Fiege O, Lewczuk P, et al. Combined CSF tau, p-tau181 and amyloid-beta 38/40/42 for diagnosing Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009;116:203-212.

Wicklund AH, Johnson N, Rademaker A. Profiles of decline in activities of daily living in non-Alzheimer dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2007;21:8-13.

Wilson SM, Brambati SM, Henry RG, et al. The neural basis of surface dyslexia in semantic dementia. *Brain* 2009;132:71-86.

Wilson SM, Henry ML, Besbris M, et al. Connected speech production in three variants of primary progressive aphasia. *Brain* 2010;133:2069-2088.

Xie SX, Forman MS, Farmer J, et al. Factors associated with survival probability in autopsy-proven frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:126-129.

Yokota O, Tsuchiya K, Arai T, et al. Clinicopathological characterization of Pick's disease versus frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin/TDP-43-positive inclusions. *Acta Neuropathol* 2009;117:429-444.

Yu CE, Bird TD, Bekris LM, et al. The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration. *Arch Neurol* 2010;67:161-170.

Zannino GD, Perri R, Pasqualetti P, Di Paola M, Caltagirone C, Carlesimo GA. The role of semantic distance in category-specific impairments for living things: evidence from a case of semantic dementia. *Neuropsychologia* 2006;44:1017-1028.