

ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR DEL TEMBLOR FAMILIAR

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía

Departamento de Neurociencias
Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

JESUS ALBERTO BERGARECHE YARZA

Tesis doctoral dirigida por:

Dr. José Félix Martí Massó

Dra. Coro Paisán-Ruiz

“siempre hay un paso más que dar”



Nací y crecí a los pies de este monte. Y crecí en un entorno social que creía, de forma especial, en unos valores entre los que destacan la cooperación y la colaboración.

Aunque esta tesis lleva mi nombre, es en realidad y, sobre todo, el fruto del trabajo de muchas personas y grupos de investigación, algunos de ellos internacionales, y una muestra notable de cooperación y compromiso sin el que hubiera sido imposible realizarla. Os quiero dar las gracias a todos. La mayoría estáis significados en la autoría de los trabajos que componen la tesis, pero no me quiero olvidar de vosotras, Maialen y Patricia, que de forma entusiasta dedicasteis muchas tardes a registrar el temblor de los pacientes y sus familiares, y Ana cuadrando presupuestos y controlando el vaivén de muestras y resultados entre Donostia y Nueva York.

Gracias a todo el equipo de los Trastornos del Movimiento, gracias por vuestra confianza y ayuda.

Quiero dar las gracias a todos los pacientes y a sus familiares. Muchas gracias por vuestra paciencia y colaboración desinteresada.

Quiero dar unas gracias muy especiales a mis directores de tesis, José Félix y Coro por vuestra brillantez, dedicación e inmensa generosidad. Y a Adolfo por tu apoyo y empeño, inasible al desaliento, de convertirme en doctor a pesar de mi resistencia.

Para finalizar, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, sin las que esto no tendría sentido. Edurne, gracias por tu imprescindible apoyo, un punto escéptico, pero finalmente decisivo, a sabiendas de que el presente perdido en esta tarea es pasado irrecuperable. Gracias a mis padres y a Eider y Amaia, que, sin saberlo, han sido tan importantes en esta tesis.

Gracias de todo corazón

ÍNDICE

1. PRESENTACIÓN	7
2. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	9
3. INTRODUCCION	11
3.1 Temblor. Concepto y aproximación histórica.....	13
3.2 Clasificación del temblor	15
3.3 El Temblor Esencial	19
3.3.1 Visión de conjunto	19
3.3.2 Manifestaciones clínicas. Variabilidad en el fenotipo	20
3.3.3 Etiología.....	27
3.3.4 Patogénesis.....	38
El estudio de las vías implicadas en la génesis del temblor	39
La topografía y la naturaleza de las lesiones estructurales asociadas al TE	42
Fisiopatología molecular	53
3.3.5 Epidemiología	55
3.3.6 Metodología del estudio de temblor esencial	56
a. Criterios diagnósticos. ¿Qué es realmente el temblor esencial?.....	57
b. Diagnóstico y evaluación del temblor	61
c. Diagnóstico diferencial	65
4. JUSTIFICACION, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	77
4.1 Justificación	79
4.2 Hipótesis	82
4.3 Objetivos	83
5. METODOLOGIA.....	85
5.1. Trabajo 1.....	87
5.2. Trabajo 2.....	90
5.3 Trabajo 3.....	93
5.4 Trabajo 4.....	99
6.RESULTADOS	105
6.1 Trabajo 1.....	107
6.2 Trabajo 2.....	108
6.3 Trabajo 3.....	114
6.4 Trabajo 4.....	123
7. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION	133
8. CONCLUSIONES.....	151
9. BIBLIOGRAFIA	155
10. ANEXO. ARTICULOS ORIGINALES	191
10.1 Trabajo 1.....	193
10.2 Trabajo 2.....	199
10.3 Trabajo 3.....	209
10.4 Trabajo 4.....	222

1. PRESENTACIÓN

Esta tesis doctoral se estructura según las directrices de la normativa para la presentación de tesis doctorales como compendio de publicaciones aprobada por la Comisión de Doctorado del Consejo de Gobierno el 24 de Julio de 2008 y modificada el 28 de abril de 2010, al amparo del régimen previsto en el RD 99/2011 del 28 de enero.

La presente memoria se basa en cuatro trabajos que pertenecen a una misma línea de trabajo. En primer lugar, se presenta un estudio de prevalencia del temblor esencial en nuestra población con una metodología de encuesta puerta a puerta. En segundo lugar, se presentan tres estudios de casos y controles pertenecientes a familias con patrón de segregación identificable con el objetivo de realizar una caracterización clínica de los endofenotipos clínicos y su causalidad genética.

Los cuatros trabajos han sido publicados en revistas indexadas y para su ejecución han recibido financiación del Instituto de Salud Carlos III (FIS 95/1907) para el trabajo: "Prevalence of Essential Tremor: A Door-to-Door Survey in Bidasoa, Spain. Neuroepidemiology 2001" y por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI10/0271) y el Institute of Neurological Disorders and Stroke of the National Institute of Health (R21NS082881, R01NS079388) para los trabajos: (1) The ACMSD gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism. J Mol Med (Berl) 2013 Dec; 91(12):1399-406; (2) SORT1 Mutation Resulting in Sortilin Deficiency and p75NTR Upregulation in a Family with Essential Tremor. ASN Neuro 2015 Aug 21; 7(4); (3) SCN4A pore mutation pathogenetically contributes to autosomal dominant essential tremor and may increase susceptibility to epilepsy. Hum Mol Genet. 2015 Dec 15; 24(24):7111-20

2. LISTADO DE ABREVIATURAS

- 18 FP-CIT: N-3-fluoropropil-2 -beta-carboximetoxi-3-beta-(4-iodofenil)-norpropano
- ACMSD: aminocarboxymuconato semialdehido decarboxilasa
- AD: Autosomica dominante
- ADN: acido desoxirribonucleico
- DAT: imagen del transportador de dopamina
- DNAJC13: *DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13*
- DRD3: Receptor D3 de dopamina
- DS: desviación standard
- DTI: Imagen del Tensor de Difusión (*Diffusion tensor imaging*)
- EA: Enfermedad de Alzheimer
- EEG: electroencefalograma
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima)
- EMG: electromiograma
- EP: Enfermedad de Parkinson
- ETM1: *essential tremor type 1*
- ETM2: *essential tremor type 2*
- ETM3: *essential tremor type 3*
- FCMTE: *Familial Cortical Myoclonic Tremor with Epilepsy (Temblor mioclónico cortical con epilepsia)*
- FUS: Proteína *Fused in sarcoma*
- GABA: Acido gammaaminobutírico
- Gpi: Globo Pálido interno:
- GWAS: estudio de asociación del genoma completo (*Genome wide association*)
- HAPLN4: *hyaluronan and proteoglycan link protein 4*
- HTRA2: *HtrA serine peptidase 2*
- Hz: Hertzios
- IgM: Inmunoglobulina M
- KCNS2: *potassium voltage-gated modifier subfamili S member 2*
- LB: Cuerpos de Lewy (*Lewy body*)
- LINGO1 y 2: *Leucin rich repeat and immunoglobulin-like domain containing protein 1, 2*
- LRRK2: *Leucine-rich repeat kinase 2*
- MAPH1: *Microtubule-Associated protein homolog*

- NGS: Secuenciación de nueva generación
- NMDA: N-methyl-d-aspartato
- NOS3: Nitric oxide synthasa 3
- OMIM: Herencia Mendeliana humana online
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PET: Tomografía por emisión de positrones
- REM: Movimiento ocular rápido
- RM: Resonancia Magnética
- RNAm: RNA mensajero: ácido ribonucleico
- SCA: ataxia espinocerebelosa
- SCN4A: sodium voltage-gated alpha subunit 4
- SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de nucleótido simple)
- SLC1A2: *Solute carrier family 1 glial high affinity glutamate transporter member 2*
- SNC: Sistema nervioso central
- SNV: variaciones de nucleótidos únicos
- SORT: *Sortilin 1*
- SPECT: Tomografía computerizada por emisión de fotón
- TAC: Tomografía axial computerizada
- TE: Temblor esencial
- TENM4: *Teneurin transmembrane protein 4*
- USP46: *Ubiquitin specific peptidase 46*
- VBM: morfometría basada en voxels
- WEA: Whole Exome Analysis
- VIM: Núcleo ventral intermedio del tálamo

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCION

3.1 Temblor. Concepto y aproximación histórica

Se define el temblor como la oscilación rítmica e involuntaria de una región funcional del cuerpo producida por contracciones alternantes o síncronas de músculos agonistas y antagonistas inervados recíprocamente (Deuschl et al., 1998a). El temblor se distingue de otros trastornos del movimiento por su ritmicidad, aceptándose que su frecuencia y amplitud son variables y sirven para su clasificación fenotípica.

A lo largo de la historia de la civilización humana, se pueden descubrir múltiples referencias sobre el temblor. Se pueden encontrar descripciones de temblor en la Ayurveda (3000 a 5000 años a.n.e), texto que compendia el sistema de medicina tradicional de la época en la India, y también aparecen representaciones gráficas del temblor en algunos jeroglíficos del antiguo Egipto y en los aforismos de Hipócrates (Grecia 300-400 a.n.e), pero es en el Eclesiastés (200 a.n.e) donde se habla de forma explícita del temblor y más tarde es Claudius Galeno de Pergamo (130-200 d.n.e), que solía tratar a los gladiadores heridos, quien describe por primera vez el temblor como un movimiento involuntario.

La historia reciente del temblor comienza mucho después, entre los siglos XVII y XIX, cuando se reconocen y definen sus principales manifestaciones al mismo tiempo que se caracterizan y clasifican las diferentes formas de temblor en base a sus patrones clínicos y a su relación con las enfermedades entonces conocidas. Así en el siglo XVII se establecieron las primeras diferencias entre el temblor de reposo (*tremor coactus*) y el temblor durante el movimiento voluntario (*motus tremolous*) (Koehler et al., 1997). En 1836, Most proporcionó las primeras descripciones sobre el temblor de acción y en 1874 Pietro Burrelli utilizó por primera vez el término de “temblor esencial”. Posteriormente, este término se ha venido utilizando como un “cajón de sastre descriptivo” para referirse a múltiples entidades de causa desconocida que cursaban con un movimiento rítmico de alguna parte del cuerpo y que no se asociaban a una

enfermedad neurológica identificable (Louis et al., 2008a). Neurólogos importantes como Romberg, Parkinson o Gowers, contribuyeron al reconocimiento de diferentes aspectos del temblor. El propio Charcot, además de mostrar en sus clases pacientes con temblor cefálico mediante el uso de un estafalario gorro adornado con plumas de avestruz que exageraba el movimiento producido por el temblor, coleccionó ejemplos de la escritura de sus pacientes con TE y ejemplos de micrografía en los casos con EP (Goetz, 2007). La segunda fase de la caracterización clínica y fisiopatológica del temblor comenzó a mediados del siglo XX. En 1949, Critchley proporcionó una descripción más detallada de la fenomenología y de la historia natural del temblor esencial (Di Dio et al., 2005). Posteriormente, la aparición de nuevas tecnologías permitió realizar avances en la fisiopatología del temblor, lo que ha permitido su clasificación de forma más adecuada en el contexto de los síndromes clínicos y avanzar en su tratamiento que finalmente han culminado en los diferentes tratamientos quirúrgicos como la estimulación cerebral profunda o las técnicas que utilizan ultrasonidos de alta intensidad.

A lo largo de la historia, han existido, sin duda, muchos personajes célebres que han sufrido temblor esencial. Quizás unos de los mejor documentados por sus propias manifestaciones y los registros escritos que de él se poseen, sea el del famoso revolucionario norteamericano Samuel Adams (1722-1803). También hay registros grafológicos que muestran la existencia de temblor en casos como Oliver Cromwell (líder político de Inglaterra, 1599 - 1658), Eugene O'Neill (dramaturgo, 1888 -1953) o Katherine Hepburn (actriz norteamericana, 1907-2003), aunque si hiciéramos un catálogo desde que disponemos de registros sonoros y de imagen, la lista sería interminable.

http://www.grafopatologia.com/articulos/temblor_esencial.html

3.2 Clasificación del temblor

En 1993, un comité de la *International Tremor Foundation*, el *Tremor Investigation Group*, en un intento de unificar criterios que permitieran mejorar la comunicación entre los clínicos que trabajaban en este campo y estimular la investigación, propuso varios sistemas de clasificación del temblor (tabla1). El primero está basado en el estado de actividad de la extremidad temblorosa; el segundo es una “clasificación sindrómica” en la que los elementos fenomenológicos del temblor se combinan para delimitar diferentes síndromes, en un intento de que fuera la base del diagnóstico etiológico y de los diferentes procedimientos terapéuticos aplicables a cada uno de ellos. Finalmente este comité construyó una extensa lista de diagnóstico etiológico del temblor en la que se incluyen todas las causas conocidas que pueden producir temblor y que se reparten en diferentes categorías etiopatogénicas : (1) enfermedades hereditarias, idiopáticas o degenerativas (2) enfermedades cerebrales de diferentes etiología (infecciosa, inflamatoria, tumores vasculares...etc. (3) enfermedades metabólicas (4) Neuropatías periféricas (5) Temblor de origen tóxico por fármacos u otras sustancias (6) Otros: temblores relacionados con la emoción, fatiga, trauma periférico, privación de tóxicos o temblores psicógenos entre otros (Deuschl, 1998a). Todos ellos se revisarán en profundidad en el apartado de del diagnóstico diferencial del temblor esencial.

Actualmente, tras el reconocimiento de la existencia de otros signos y síntomas motores y no motores además del temblor en lo que entendemos como TE, se está desarrollando un nuevo esquema de clasificación de los temblores por parte de la *International Parkinson and Movement Disorders Society Task Force on Tremor*. En este esquema, el temblor en ausencia de otros signos neurológicos se denomina temblor aislado y el temblor en combinación con otros signos se denomina temblor combinado. Muchos síndromes de temblor aislados y combinados pueden definirse a partir de síntomas y signos clínicos recurrentes o únicos, incluyendo características históricas (edad de inicio, antecedentes familiares y evolución temporal) y características del temblor (distribución del cuerpo, estado de activación,

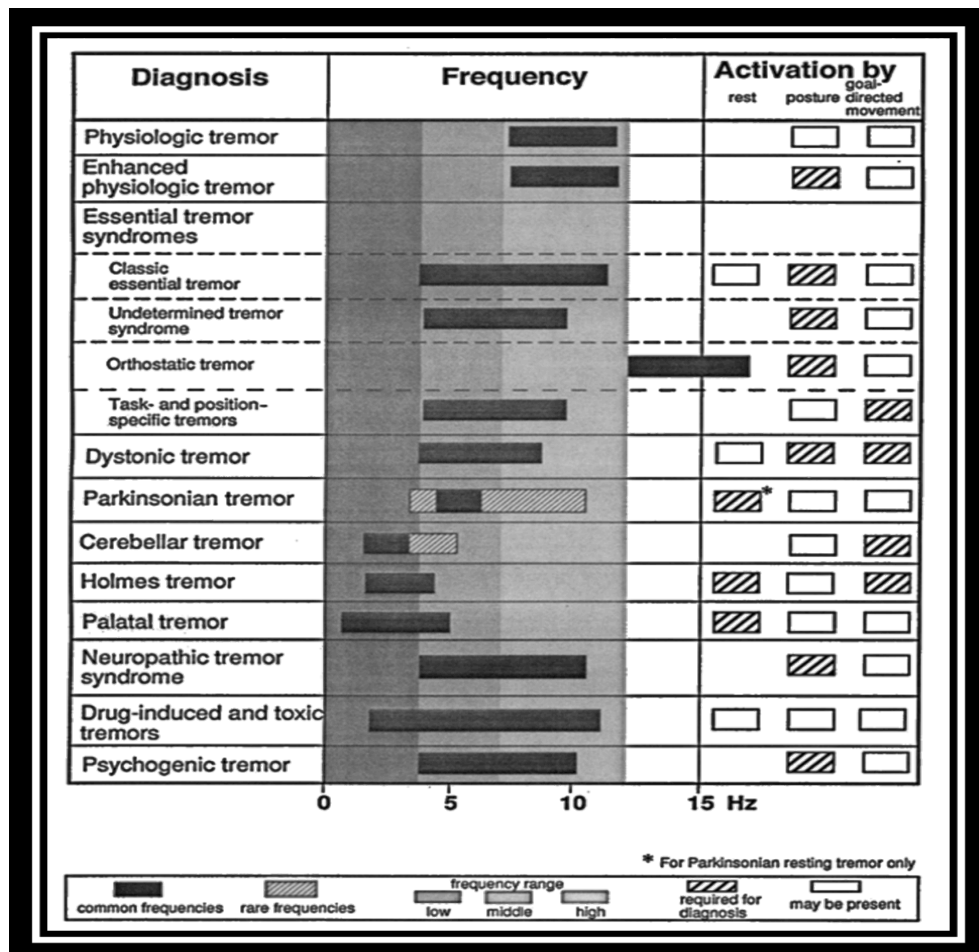
características asociadas). Según su propuesta, el temblor esencial se convertiría simplemente en un síndrome y no en una enfermedad específica y debería ser definido y utilizado consistentemente o, el término, debería ser abandonado (Elble, 2016).

Tabla 1. Clasificación del temblor.

Clasificación por estado de actividad (Modificado de Elble, 2000a)

1. *Temblor de reposo*: presente cuando una extremidad está en reposo total (totalmente soportada contra la acción de la gravedad y no asociada con ningún movimiento voluntario). Frecuencia habitual entre 3-6 Hz.
2. *Temblor de acción*: ocurre durante cualquier movimiento voluntario de una parte del cuerpo. Frecuencia habitual entre 3-10 Hz:
 - *Postural*: temblor que aparece durante el mantenimiento voluntario de una postura en contra de la gravedad.
 - *Cinético*: temblor que se hace evidente durante cualquier tipo de movimiento voluntario y no cambia a través de todas las fases del movimiento.
 - *Intencional*: temblor que aumenta en amplitud a medida que se acerca al objetivo.
 - *Tarea-específico*: temblor que aparece o se exagera durante la realización de un movimiento en particular (p.e. en actividades específicas como la escritura, tocar un instrumento musical, etc. La tarea a realizar requiere, normalmente, de un alto grado de precisión y práctica)
 - *Isométrico (incluye el ortostático)*: el temblor se hace presente con la contracción de los músculos contra resistencia sin generar movimiento de la parte del cuerpo afectada.

Clasificación sindrómica del temblor (tomado de Deuschl, 1998a).



Clasificación de los síndromes tremóricos aislados (tomado de Elble, 2016).

Síndrome Tremórico	Características
Temblores esenciales clásicos	Temblores de acción bilaterales en extremidades superiores con o sin la presencia de temblor cefálico, cuello, voz que evoluciona de forma lentamente progresiva durante décadas
Temblores esenciales rápidamente progresivos	Temblores de acción bilaterales en extremidades superiores con o sin la presencia de temblor cefálico, cuello, voz que evoluciona de forma rápidamente progresiva en pocos años
Temblores de acción de inicio tardío	Temblores de acción bilaterales en extremidades superiores con o sin la presencia de temblor cefálico, cuello, voz que comienza después de los 65 años
Temblores focales	Temblores aislados de una parte del cuerpo (p.e. cara, cuello o extremidad superior)
Temblores tarea-específicos	Temblores aislados que son inducidos por una tarea motora específica (p.e. escribir, tocar un instrumento)
Temblores ortostáticos primarios	Temblores en extremidades inferiores que se presentan tras mantener la bipedestación; generalizados, altamente coherentes, a una frecuencia de 13-18 Hz
Temblores de acción monosintomáticos con temblor de reposo	Temblores de acción aislados con temblor de reposo en una o ambas extremidades superiores

3.3 El Temblor Esencial

3.3.1 Visión de conjunto

El temblor esencial clásico se define como un temblor bilateral en brazos o manos, generalmente simétrico, que se presenta con el movimiento voluntario o con el mantenimiento de la postura en contra de la gravedad. Es el trastorno del movimiento más frecuente en adultos. Actualmente se considera que el TE es una entidad plurietiológica lo que explicaría, en parte, la dificultad para la identificación de sus causas y para el desarrollo de tratamientos específicos. En algunos casos, los pacientes con TE muestran además un conjunto variable de otros síntomas motores y no-motores (Louis, 2016a). La extensión e importancia relativa de los síntomas no-motores está en discusión, pero se reconoce la existencia de cambios cognitivos y afectivos en algunos de los pacientes. Las características clínicas en lo que se refiere a la edad de presentación, la intensidad o la simetría del temblor, así como la presencia o no de signos cerebelosos, distónicos o parkinsonismo, también son muy diferentes de unos pacientes a otros. Con respecto a su fisiopatología, sabemos que oscilaciones anormales en las vías cerebelo-tálamo-corticales producen temblor, pero desconocemos los mecanismos estructurales, bioquímicos y genéticos implicados en su génesis. Los tratamientos con fármacos (p.e, primidona o propranolol) tienen una eficacia limitada mientras que la estimulación profunda cerebral subtalámica y en el núcleo ventral intermedio (VIM) son opciones terapéuticas efectivas para aquellos pacientes con un temblor invalidante en los que la respuesta a fármacos es inadecuada. La lesión del VIM mediante ultrasonidos de alta frecuencia (*High intensity focused ultrasound (HIFU)*) es una técnica terapéutica de introducción reciente, cuyos resultados preliminares son muy prometedores. Aunque en general no se trata de una enfermedad grave, el temblor esencial puede producir una discapacidad notable tanto desde el punto de vista social como ocupacional, por lo que el calificativo de “benigno” que le acompañaba para diferenciarlo de otros temblores presentes en enfermedades neurodegenerativas más graves, ha sido eliminado (Louis & Okun, 2011).

3.3.2 Manifestaciones clínicas. Variabilidad en el fenotipo

El temblor esencial se caracteriza por un temblor postural o cinético de predominio en extremidades superiores, pero que puede afectar también a otras partes del cuerpo. La forma cinética ocurre con cualquier tipo de movimiento voluntario, visualmente guiado o no, aún en aquellos realizados sin finalidad (Deuschl et al., 1998a; Louis et al., 2013). Una forma particular del temblor cinético es el temblor de intención cuya característica principal es el aumento en su amplitud al final de un movimiento dirigido y visualmente guiado hacia un objetivo concreto. Aunque este subtipo de temblor se observa frecuentemente en el TE, su presencia no es imprescindible para poder hacer el diagnóstico (Deuschl et al., 2000). El TE se presenta principalmente en las extremidades superiores (97%) y afecta menos frecuentemente a cabeza (48%), voz (62%), lengua (30%), mentón (9%), tronco (4%) y a las extremidades inferiores (9%) (Whaley et al., 2007). Las mujeres tienen más frecuentemente temblor cefálico que los hombres (Hardesty et al., 2004). El estudio electromiográfico de superficie revela dos posibles patrones, uno de tipo síncrono (73%) y otro de tipo alternante (27%). Su frecuencia varía entre 4-12 Hz y su amplitud suele ser baja (menor de 200mv) (Hsu et al., 1990). La edad de inicio difiere entre los casos familiares y esporádicos y aunque evoluciona de forma progresiva, la rapidez de su evolución depende de la edad de inicio, siendo más acelerada en aquellos pacientes en los que debutan más tarde (Gironell et al., 2015).

El concepto tradicional del temblor esencial ha sido el de un trastorno tremorígeno monosintomático. Esta definición excluye todas aquellas alteraciones neurológicas diferentes al temblor y considera otros síntomas o signos neurológicos adicionales como “banderas rojas”, señales de alarma de que otra enfermedad está presente, bien de forma aislada o bien en combinación con el temblor esencial (Deuschl et al., 1998a; Bain et al., 2000). Sin embargo, en los últimos años el temblor esencial está siendo reconocido como una entidad clínica de presentación heterogénea, particularmente en lo que respecta a los síntomas no-motores (Louis 2016a; Eible 2013a).

a. Signos y síntomas motores

En los pacientes con TE es frecuente encontrar otros signos motores distintos al temblor. Entre los que son frecuentes, encontramos la disminución de braceo al caminar y el aumento de tono en extremidades (Jankovic 2002; Elble & Tremor Research Group 2006b) que junto con la presencia de un temblor cinético grave pueden llegar a interrumpir o dificultar la realización de tareas que requieran la ejecución de movimientos finos y de precisión.

El temblor de reposo es un hallazgo frecuente en el TE, particularmente en aquellos individuos con temblor grave y de larga evolución, siendo el componente de reposo menos severo que el de acción, al contrario de lo que ocurre en la enfermedad de Parkinson (Rajput et al., 1993; Cohen et al., 2003; Rajput et al., 2004; Djaldetti et al., 2008). Los trastornos del equilibrio a su vez son frecuentes en sujetos con TE (Singer et al., 1994; Stolze et al., 2001; Klebe et al., 2005; Hoskovcova et al., 2013). En estos pacientes se puede observar la existencia de alteraciones significativas en múltiples parámetros del control postural y movilidad funcional de forma independiente al área corporal afectada por el temblor y a la severidad del mismo (Parisi et al., 2006). Cuando se estudian estos pacientes de forma detallada también se describen cambios en el inicio de la marcha, que son distintos a los observados en la EP (Fernández et al., 2013). La descripción, en algunos casos de TE, de la existencia de una dificultad para la marcha en tándem y de un temblor cinético que recuerda a los temblores intencionales cerebelosos (Deuschl et al., 2000), es consistente con otras evidencias que revisaremos más adelante y que orientan a que el cerebelo está implicado en la tremorogénesis. Sin embargo, y aunque algunos pacientes pueden exhibir un patrón de marcha cautelosa, en general no suelen presentar una ataxia franca (Kronenbuerger et al., 2009; Roemmich et al., 2013). La aparición de un patrón de marcha cautelosa junto con un aumento en la frecuencia de caídas y una mayor necesidad de ayudas para la deambulación, son circunstancias que se observan de forma más frecuente en los pacientes con TE de edad avanzada, con mayor duración del temblor y en los casos que presentan temblores axiales

(Louis et al., 2012e; Cinar et al., 2013; Hoskovcova et al., 2013) y deterioro cognitivo (Rao et al., 2013; Rao et al., 2014). Hay que señalar que todas estas alteraciones del equilibrio pueden empeorar y, en muchos casos, depender de la existencia de otras comorbilidades como neuropatías periféricas, déficits vestibulares, consumo de fármacos u otros factores que afectan a la estabilidad. También se han descrito alteraciones oculomotoras que consisten en la disminución de la aceleración inicial de los movimientos de seguimiento ocular, aumento de las latencias de los movimientos sacádicos y en el enlentecimiento de sus velocidades máximas (Helmchen et al., 2003, Gitchel et al., 2013).

b. Signos y síntomas no-motores

En estos últimos años hay un aumento del interés en el estudio de los síntomas no-motores del temblor esencial (Wu et al., 2015; Lee et al., 2015; Louis, 2016a). Algunos autores han reconocido la existencia de una gran variedad de déficits cognitivos, psiquiátricos, sensitivos y otros como los trastornos del sueño, como parte del síndrome clínico (Gasparini et al., 2001; Lombardi et al., 2001; Sahin et al., 2006; Louis, 2010; Li et al., 2011; Fabbrini et al., 2012; Chandran et al., 2012) aunque la cuestión de si estos casos constituyen o no un subtipo diferente de TE, es objeto de debate, particularmente en lo que se refiere al subgrupo de pacientes añosos (Deuschl & Elble, 2009). Hay muchos estudios que han documentado la existencia de un mayor número de déficits cognitivos en pacientes con TE en relación con los controles (Janicki et al., 2013). Estos déficits pueden ocurrir no sólo en pacientes con TE de inicio tardío sino también en jóvenes (Sengul et al., 2015). Los déficits cognitivos parecen ser progresivos y los estudios epidemiológicos han demostrado que tanto el deterioro cognitivo ligero como la demencia son más prevalentes en los casos de TE que en los controles. En un estudio poblacional llevado a cabo en Madrid (Benito-León et al., 2006), se describió que la probabilidad de padecer demencia era aproximadamente el doble en los casos TE con inicio tardío comparados con los sujetos controles sin temblor. Este mismo grupo, en un estudio

prospectivo con tres años de seguimiento a pacientes con TE sin demencia, encontró que la demencia incidental era cercana al doble en los casos de TE comparado con los controles. (Bermejo-Pareja et al., 2007). Tasas similares a estas se han reportado posteriormente en otro estudio poblacional en el norte de Manhattan (Thawani et al., 2009). Se ha sugerido incluso, que los cambios cognitivos podrían preceder a las manifestaciones motoras del TE (Benito-León et al., 2013b).

Los dominios cognitivos más afectados son las funciones ejecutivas y la memoria, pero los déficits no están limitados ellos. Cuando se utilizan test neuropsicológicos, se han observado rendimientos inferiores en tareas de atención auditiva y visuales complejas, en la fluidez verbal semántica y en el recuerdo inmediato. Los déficits observados ponen de manifiesto una dificultad en la iniciación y mantenimiento de las estrategias de procesamiento de la información (Tröster et al., 2002), así como una alteración del procesamiento temporal que correlación de forma significativa con fluidez verbal semántica, pero no con la intensidad del temblor (Pedrosa et al, 2016). A pesar de que la afectación del cerebelo, tal y como presumiblemente se produce en el TE, por sí sola podría explicar parte de la disfunción cognitiva observada, para algunos autores no explicaría las altas tasas de deterioro cognitivo ligero y demencia objetivada en los casos de TE e hipotetizan la posible naturaleza neurodegenerativa de las mismas (Janicki et al., 2013)

Los pacientes con TE presentan más alteraciones neuropsiquiátricas que los controles y muestran unas características de personalidad específicas (Louis et al., 2005; Lorenz et al., 2006). Tienden a presentar trastornos ansiosos (Tan et al., 2005), síntomas depresivos (Louis et al., 2001), fobia social (Schneier et al., 2001), a asumir menos riesgos, a estar más preocupados (en general) y tienen un carácter más tímido (Chatterjee et al., 2004). Muchos estudios han mostrado que los pacientes con TE tiene más síntomas depresivos y quizás una mayor prevalencia de depresión clínicamente definida que los controles. (Sengul et al., 2015 ; Fabbrini et al., 2012 ; Chandran et al., 2012 ; Lee et al., 2015). Además, en uno de los estudios se describe que los pacientes con TE presentan un perfil específico de síntomas depresivos

que es distinto a los controles con depresión, pero sin TE (Li et al., 2011). Según algunos autores (Louis, 2010), estos trastornos afectivos formarían parte de la disfunción subyacente al proceso de la enfermedad y no serían una consecuencia del propio temblor, aunque en el estudio de Chandran et al., el grado de severidad del temblor se asociaba con puntuaciones más altas en las escalas de depresión (Chandran et al., 2012). Con los datos disponibles hasta la fecha, se podría concluir que las bases biológicas de la depresión en el TE no son conocidas, pero existe la posibilidad de que la depresión pueda ser tanto un síntoma primario como secundario al temblor, por lo que los mecanismos fisiopatológicos pueden ser heterogéneos y complejos (Louis 2016).

En un estudio en el que se administró una escala de evaluación de apatía a 79 casos de TE, distonía, EP y controles (Louis et al., 2012), el resultado de las puntuaciones de la escala fue más alto en los casos de TE, distonía y EP que en los controles y un análisis de los resultados, estratificado por la presencia o no de síntomas depresivos, indicó la existencia de un grupo de pacientes con TE apáticos pero no deprimidos, sugiriendo que la apatía se presentaba de forma independientes a la depresión en estos pacientes. Sin embargo, se necesitan más estudios que confirmen este dato y estudien las bases biológicas que lo expliquen.

La existencia de ansiedad es una constante en los estudios de TE que la han analizado, presentando cifras de prevalencia que llegan al 71% de los casos (Chandran et al., 2012; Sengul et al., 2015). En el TE es frecuente observar una forma particular de ansiedad como es la fobia social (Schneier et al., 2001) y es llamativa la presencia de síntomas ansiosos en sujetos que presentan formas muy leves de TE (Dogu et al., 2005).

La mayoría trastornos del movimiento (EP, E. de Huntington) exhiben cambios en la personalidad, y, en opinión de algunos autores, el TE no es una excepción. Algunos estudios, han examinado el perfil de personalidad de los casos de TE utilizando el *Tridimensional Personality Questionnaire*, que mide tres dominios de la personalidad: evitación del riesgo, búsqueda de la novedad y la dependencia de la recompensa. En uno de ellos se apreció que la

preocupación anticipada y el pesimismo, así como la fatigabilidad y la astenia estaban claramente elevadas en los casos de TE (Thenganatt & Louis, 2012b). En esta misma línea, está descrito que son socialmente más aprehensivos, escépticos, cautos y se reprochan más a sí mismos (Lorenz et al., 2011). Una vez más, estos estudios no permiten aclarar si este perfil en la personalidad es pre o comórbido con la enfermedad. Sin embargo, en un trabajo reciente diseñado para evaluar la presencia de un trastorno de personalidad obsesiva-compulsiva en pacientes con atrofia multisistémica, parálisis supranuclear progresiva y TE, encuentran una baja frecuencia del trastorno en los pacientes con TE que es similar a controles (Nicoletti et al., 2016)

También se han descrito varias alteraciones sensoriales ligadas al TE, incluyendo la hipoacusia y el déficit olfatorio. La hipoacusia ha sido documentada en varios estudios, aunque los resultados han resultado variables. En el estudio publicado por Ondo y cols, los pacientes con TE presentaban hipoacusia con un umbral anormal para altas frecuencias en la audiometría, lo que fue interpretado como una hipoacusia neurosensorial para altas frecuencias (Ondo et al., 2003). Sin embargo, en otro estudio en el que a los sujetos se les practicaron audiometrías, medidas de función coclear y potenciales evocados, los grupos se diferenciaban para frecuencias bajas (250 y 500 Hz) pero no para las altas (1000, 2000, 4000 y 6000 Hz). En este caso los autores concluyen que la hipoacusia observada sería debido a la existencia de patología coclear más que retrococlear (Balaban et al., 2012). Esta conclusión ha sido apoyada por los resultados de un trabajo más reciente (Yilmaz et al., 2015). Los estudios realizados son escasos como para poder aclarar las bases biológicas de la hipoacusia en el TE, no obstante, es interesante resaltar que algunas formas de ataxia hereditaria se asocian a sordera, indicando que la patología puede extenderse más allá del cerebelo afectando a vías neurosensoriales involucradas en la audición (Sakakibara et al., 2014).

La disfunción olfatoria ha sido descrita en varias enfermedades neurodegenerativas y por esa razón ha sido también estudiada en pacientes con TE, aunque los escasos estudios realizados han ofrecido resultados dispares. En dos estudios se describe alteraciones olfatorias

(Applegate, 2005; Louis et al., 2002) mientras que en otro posterior no lo hacen (Shah et al., 2008), lo que sugiere la existencia de diferencias entre los casos y controles de dichos estudios, por lo parece necesario replicar estos estudios en subgrupos de sujetos con TE. Las bases del déficit olfatorio en el TE, en caso de que existiera, no están claras, aunque es conocido que el cerebelo puede jugar un papel en el procesamiento central olfatorio y que los pacientes con ataxias degenerativas tienen peor rendimiento en test de olfacción que los controles (Applegate et al., 2005)

Los trastornos de la regulación del sueño están recibiendo mucha atención en el estudio de la EP y en otras enfermedades neurodegenerativas. Los datos agregados de los estudios actualmente disponibles sugieren la existencia de una forma leve de disregulación del sueño presente en algunos casos de TE y que en ocasiones precede el inicio de las manifestaciones motoras (Gerbin et al., 2012; Chandran et al., 2012; Sengul et al., 2015; Chen et al., 2015; Lee et al., 2015; Adler et al., 2011b; Barut et al., 2015; Benito-León et al., 2013). Se cree que el *locus ceruleus* juega un papel en la regulación del sueño y en este sentido es interesante apuntar que en algunas series de estudios *postmortem* se describe la presencia de cuerpos de Lewy en los cerebros de los pacientes con TE, particularmente en el *locus ceruleus*, (Louis et al., 2007a).

c. Edad de presentación.

Los estudios en pacientes ancianos con TE informan de la existencia de una serie de características clínicas adicionales, como son la demencia y el aumento de la mortalidad, que suele encontrarse en trastornos neurodegenerativos (Chandran et al., 2012b; Benito-León et al., 2006b) mientras que la mayoría de los pacientes de aparición temprana hacen una vida aparentemente normal durante décadas. En base a un estudio realizado en una cohorte de pacientes de un estudio epidemiológico, se ha demostrado que el temblor de acción de inicio más allá de los 70 años es un predictor independiente de mortalidad asociado con signos de

envejecimiento temprano medido este con parámetros motores y cognitivos (Deuschl et al., 2015). Además, mediante estudios de coherencia EMG-EEG se ha demostrado que las redes centrales subyacentes al temblor son distintas para los casos de inicio temprano y tardío (Muthuraman et al., 2015). Un estudio reciente confirma la existencia de una distribución bimodal en lo que respecta a la edad de inicio. El TE de inicio temprano y tardío se diferencian en la velocidad de progresión, la frecuencia de la existencia de una historia familiar positiva y el efecto del alcohol en el temblor. Estas características diferenciales podrían ser marcadores de diferencias etiopatológicas entre ambos grupos tal y como ocurre en el caso de otras enfermedades (Hopfner et al., 2016b)

Definir adecuadamente los diferentes fenotipos existentes dentro de lo que hasta ahora se ha considerado TE es uno de los retos que tenemos, dado que ello nos permitirá comprender su prevalencia, su evolución en el tiempo, los factores que los predisponen, y en última instancia, su base biológica. Esta clasificación depende de forma crítica de la realización de una historia clínica y una exploración meticolosas.

3.3.3 Etiología

La etiología del temblor esencial es desconocida. Según la hipótesis más aceptada, mutaciones genéticas o alelos que confieren un aumento de riesgo interaccionarían con factores ambientales u otras comorbilidades para producir una oscilación anormal en la descarga neuronal en algunas zonas del cerebro y una sincronización secundaria de vías motoras centrales y periféricas que finalmente conducirían a la producción del temblor (Schnitzler et al., 2009).

Hace muchos años que se reconoce la existencia de casos familiares y de casos esporádicos, aunque la frecuencia de cada uno de ellos no está clara. Los pacientes con TE refieren frecuentemente una historia familiar de temblor y aunque sus rangos son muy variables, las cifras van desde el 17% al 100% (Busenbark et al., 1996; Louis & Ottman 1996; Whaley et

al., 2007). La mayoría de los estudios sugieren que se trata de una enfermedad familiar en un 50–70% de los casos y que la frecuencia de la historia familiar es inversamente proporcional a la edad de inicio (Sullivan et al., 2004; Louis & Ottman, 2006). Los sesgos de selección observados en los estudios basados en registros clínicos en comparación con los de base comunitaria podrían explicar estas significativas diferencias en la estimación de la existencia de una historia familiar positiva (Louis & Ottman 1996). En aquellos estudios comunitarios donde los casos han podido ser estudiados de forma directa y existen registros detallados sobre la herencia, la historia familiar de temblor aparece de forma constante (Larsson & Sjogren, 1960) y muestra un patrón de herencia autosómica dominante con una alta penetrancia a partir de los 65 años (Bain et al., 1994; Lorenz et al., 2004). Los familiares de primer grado de los pacientes con temblor esencial tienen 5 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que los controles y si el temblor debuta antes de los 50 años la probabilidad de que sus familiares lo presenten aumenta hasta 10 veces la de los controles (Louis et al., 2001c). La ocurrencia de casos no-familiares o “esporádicos”, fenomenológicamente idénticos a los familiares es bien conocida, pero hay que recordar la posibilidad de la existencia de “otras causas genéticas” dentro de los casos esporádicos incluyendo la posibilidad de una penetrancia reducida de las mutaciones AD, la aparición de nuevas mutaciones, una herencia no-Mendeliana/multifactorial o la existencia de fenocopias (Ma et al., 2006; Deng et al., 2007; Yoo et al., 2008; Zimprich 2012)

Los **estudios en gemelos** son una poderosa herramienta para el estudio de la genética del TE. Estos estudios han puesto de manifiesto una mayor importancia del componente genético que el ambiental en la génesis del temblor esencial (Tanner et al., 2001; Lorenz et al., 2004). En el primero de estos dos estudios, la concordancia en gemelos monocigóticos (0.60) fue más del doble que el de los gemelos dicigóticos (0.27) (Tanner et al., 2001). En el segundo (Lorenz et al., 2004), incluyendo sólo aquellos casos definidos como temblor esencial probable según criterios del *Tremor Investigation Group* (Deuschl et al., 1998), mejoran las cifras de concordancia para los gemelos monocigóticos hasta el 0.93 frente al 0.29 para los gemelos dicigóticos, estimándose la heredabilidad como factor potencial para el desarrollo del temblor

esencial en más de un 90% de los casos.

Estudios moleculares. Los estudios de ligamiento han identificado tres *loci* candidatos con transmisión autosómica dominante:

(1) ETM1 localizado en el cromosoma 3q13 (OMIM 190300), identificado en 16 familias islandesas (Gulcher et al., 1997) y que posteriormente fue confirmado en otras familias no relacionadas (Illarioshkin et al., 2002; Testa, 2013). Más tarde, se describió que una variante Ser9Gly del gen del receptor de dopamina D3 (DRD3) localizado en esta región cromosómica estaba relacionada con TE. El gen DRD3 codifica el receptor de dopamina D3, un miembro de la familia de los receptores dopaminérgicos D2 que se expresa en el sistema límbico, ganglios basales y en las células de Purkinje del cerebelo, que han sido implicadas en la patogénesis del TE (Jeanneteau et al., 2006). Dado que en su momento no se realizó un estudio de genes candidatos, no está claro si la variante Ser9Gly cosegragaba con la enfermedad ligada a ETM1 en las familias originales de Gulcher e Illarioshkin. En un metaanálisis más reciente tampoco se ha encontrado asociación para la variante de DRD3 y el temblor esencial (Mao et al., 2013).

(2) ETM2 que está localizado en 2p22-p25 (OMIM 602134) y fue identificado en 1997 en una familia americana de origen checo con un TE con herencia AD (Higgins et al., 1997). Tras analizar otras tres familias americanas con TE, el gen fue localizado a un intervalo 9.1-cM entre los *loci* D2S224 y D2S405; los individuos afectados de las cuatro familias presentaban el mismo haplotipo (Higgins et al., 1998). Finalmente, en un estudio diseñado para analizar una muestra de individuos con TE de herencia AD no relacionados, se encontró un haplotipo ancestral en el cromosoma 2p24.1 que segregaba con el fenotipo de TE en el 29% de los sujetos estudiados (Higgins et al., 2003). El mismo grupo describió también una asociación entre el temblor esencial y una variante Ala265Gly del gen HS1-BP3 localizado en la región del cromosoma 2p24 (Higgins et al., 2005; Shatunov et al., 2005; Higgins et al., 2006), pero esta variante del gen HS1-BP3 no se ha encontrado en la mayoría de las familias con TE estudiadas y es además una variante común en la población general (Deng et al., 2005).

(3) ETM3 (OMIM 611456), localizado en el cromosoma 6p23, fue descrito en dos familias norteamericanas con temblor esencial más distonía, pero no ha podido ser replicado en series de familias que presentan únicamente temblor esencial (Shatunov et al., 2006).

Recientemente se ha publicado un nuevo locus candidato en el cromosoma 5. El ligamiento se produce en la región del cromosoma 5q35, en un intervalo que contiene 41 genes, que incluye el gen GABRP que codifica una unidad del receptor GABA-A. Aunque esto lo hace un gen candidato prometedor, la secuenciación del exoma no ha identificado una variante potencialmente causal en esa región (Hicks et al., 2016)

Kuhlenbaumer y cols, en su metaanálisis sobre los estudios genéticos en TE concluyen que ETM2 es el gen candidato más prometedor como causa de TE monogénico (Kuhlenbaumer et al., 2014). Sin embargo, la heterogeneidad genética del TE ha sido puesta de manifiesto en múltiples ocasiones tras la publicación de gran cantidad de estudios en familias con TE en los que se han podido excluir los genes conocidos, por lo que hay consenso en la posible implicación otros *loci* genéticos, aunque dado que ni las variantes genéticas causales ni sus proteínas han sido identificadas, todo esto permanece en el terreno de lo hipotético (Abbruzzese et al., 2001; Kovach et al., 2001; Illarioshkin et al., 2002; Singleton et al., 2003; Shatunov et al., 2006; Aridon et al., 2008; Pasini et al., 2013; Testa, 2013).

El fracaso relativo en los estudios de ligamiento y la disponibilidad de las nuevas técnicas de secuenciación condujeron a la realización de estudios GWAS (*Genome-wide association*) de grandes cohortes de pacientes dirigidos a la búsqueda de variantes de alelos que se asocien a un aumento en el riesgo de sufrir temblor esencial. Hay variantes del gen LINGO1 [MIM 609791] que se han asociado a un aumento en el riesgo de sufrir TE (*Odds ratio* ≤ 1.6), en particular en pacientes con historia de TE familiar (Stefansson et al., 2009). La variante rs9652490 ha sido asociada tanto con el TE como con la EP (Deng et al., 2007; Deng et al., 2012; Vilarino-Guell et al., 2010) y otros metaanálisis recientes apoyan la asociación entre el polimorfismo rs11856808 con el TE esporádico y familiar (Jiménez-Jiménez et al., 2012). Por su parte, LINGO2 [MIM 609793], ha sido asociado con el riesgo de presentar TE y

con la edad de inicio del mismo (Vilarino-Guell et al., 2010). El mecanismo por el cual estas variantes pueden conferir un aumento en el riesgo de sufrir TE no es conocido, pero LINGO1 se expresa en los axones de las células cerebelosas y ha sido también implicado en la regeneración axonal; de forma que cuando está mutado podría ser responsable de la edematización fusiforme de los axones de las células de Purkinje, tal y como se observa en las muestras anatomopatológicas de pacientes con temblor esencial (Deng et al., 2012; Yu et al., 2012; Kuo et al., 2013).

Otro estudio GWAS, identificó un polimorfismo en el gen SLC1A2 [MIM 600300] como potencial factor de riesgo para sufrir TE (Thier et al., 2012). El gen SLC1A2 codifica un transportador de alta afinidad para la recaptación de glutamato en células gliales. Aunque esta característica funcional, su relación con otras enfermedades neurodegenerativas, así como los datos de asociación genética entre el TE y la variante intrónica rs3794087 sugieren que SLC1A2 podría ser buen candidato como para ser considerado factor de riesgo para esta enfermedad, existen solamente dos estudios de replicación (Tan et al., 2013; Yu et al., 2013), y sólo el segundo de ellos confirmó los resultados originales. También se han encontrado mutaciones en gen FUS [MIM 137070] que son diferentes de las mutaciones en FUS descritas en la esclerosis lateral amiotrófica. Merner y cols, identificaron una mutación en FUS c.868C> T (p. Gln290) como variante patológica en una familia con temblor esencial con herencia autosómica dominante (Merner et al., 2012). Estos investigadores identificaron esta variante genética en un subgrupo de los miembros de la familia diagnosticados como “temblor esencial definitivo”, justificando su no presencia en otros miembros también afectados de la misma familia, por la existencia de fenocopias. La secuenciación del gen FUS en más de 200 sujetos con TE y en controles proporcionó una nueva variante (p. R377W) potencialmente patogénica (Rajput et al., 2014), mientras que una tercera variante de FUS se asoció también con un aumento en el riesgo de sufrir TE en un estudio realizado en población china (Wu et al., 2013). Los resultados de estos estudios no han sido confirmados todavía de forma independiente y otros estudios posteriores no han replicado la asociación entre variantes del gen FUS y el temblor esencial en

ninguna de las diferentes poblaciones estudiadas (Kuhlenbaumer et al., 2014; Hopfner et al., 2015). También se ha encontrado una asociación significativa del polimorfismo rs12456492 del gen RIT2 que codifica una proteína de la superfamilia de las GTPasas, con la EP y el TE (Emamalizadeh et al., 2016). También se han identificado mutaciones en el gen HTRA2 [MIM 606441] en una familia turca de seis generaciones con consanguinidad (Unal-Gulsuner et al., 2014) y variantes patogénicas en el gen TENM4 [MIM 610084] en una población española (Hor et al., 2015) pero este resultado no se ha podido replicar en población china en la que sin embargo se ha detectado la mutación c.4324 G>A TENM4 en dos controles asintomáticos lo que pone en cuestión de que se trate de una mutación verdaderamente patógena (Chao et al., 2016) . En otro estudio reciente, se han identificado un número de genes candidatos como el NOS3, KCNS2 (KV9.2), HAPLN4 (BRAL2) y USP46, que son muy interesantes porque, aunque los estudios funcionales necesarios para evaluar su patogenicidad no han sido realizados, estos genes se expresan en el cerebelo (concretamente en las células de Purkinje) y tienen además repercusión en la función del sistema GABA (Liu et al., 2015). Finalmente, ninguno de los polimorfismos estudiados de los genes Heme oxigenasa 1 y 2 (HMOX1 rs2071746 y HMOX2 rs1051308) parecen conferir un mayor riesgo de sufrir TE (Ayuso et al., 2015). Recientemente, se han publicado los resultados de un gran estudio GWAS de casos de TE de Europa y América del Norte que detectó la asociación con SNPs en 3 regiones cromosómicas cerca de STK32B, PPARGC1A y CTNNA3. Sin embargo, no pudieron replicar la asociación con el TE de dos polimorfismos previamente descritos como son rs3794087 en SLC1A2 y rs9652490 en LINGO1 (Muller et al., 2016).

Análisis de genes candidatos. Hay muchos estudios que han documentado una asociación entre el fenotipo del TE y otras enfermedades neurológicas como la EP, distonía, mioclonía, neuropatías hereditarias, y otras enfermedades neurológicas (Jankovic, 2002). Por lo tanto, el análisis de las anomalías genéticas que se conoce que causan las enfermedades neurológicas asociadas podría dar pistas sobre la genética del TE. No se han

identificado mutaciones en el gen parkin en 110 pacientes italianos con TE (Pigullo et al., 2004). Aunque Tan y cols, describieron que la variante 263 del haplotipo NACP-Rep1 del gen α -sinucleína era más frecuente (OR = 6.42) en pacientes americanos con TE (46 casos) comparado con controles (100 casos), Pigullo et cols., en un estudio de asociación en 106 pacientes y 90 controles no consiguieron identificar ninguno de los 13 haplotipos estudiados del gen α -sinucleína como posibles factores de susceptibilidad del TE. Estos resultados contradictorios podrían estar en relación con el pequeño número de casos y controles utilizados en ambos estudios (Tan et al., 2000; Pigullo et al., 2003). Sin embargo, en otro estudio más reciente tampoco se ha encontrado ninguna asociación entre el temblor esencial y variantes del gen α -sinucleína (Ross et al., 2011). Aunque está descrito el caso de una mujer con EP y mutación de LRRK2-IVS33 con una clínica de inicio de temblor con respuesta a propranolol (Skipper et al., 2005), no se ha encontrado ninguna mutación en LRRK2-G2019S, I2012T y I2020T en 272 pacientes con TE (Deng et al., 2006). La variante c.2564A>G (p.(N855S)) del gen DNAJC13, representa la primera variante identificada en ambas enfermedades y sugiere que la regulación del tráfico intracelular mediado por la dinámica de la claritrina (una proteína que participa en la formación de vesículas endocelulares) podría tener importancia en la fisiopatología de un subgrupo de pacientes con TE (Rajput et al., 2015). CHCHD2 es un nuevo gen cuyas mutaciones son capaces de producir EP, pero no han encontrado mutaciones patogénicas en población china con TE en este gen (Wu et al., 2016), así como tampoco se asocian al TE las variantes rs3758549 y rs4919621 del gen PITX3, que ha demostrado tener un importante papel en la diferenciación y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Chen et al., 2016)

El ligamiento de ETM3 en familias con TE y distonía (Shatunov et al., 2006) y las descripciones de distonía en miembros de familias de pacientes con TE sugerirían una conexión genética entre estas dos enfermedades, pero todavía no ha sido confirmada (Hedera et al., 2010; Louis et al., 2013g). Por su parte, la existencia de ligamiento del locus DYT1 en el cromosoma 9q32-34 ha sido excluido en varios estudios independientes (Conway et al., 1993;

Illarioshkin et al., 2002) al igual que el gen ANO3, descrito en la distonía de torsión, que tampoco está implicado en la etiología del TE (Hopfner et al., 2014).

Vilarino-Guel encontró que el haplotipo H1 del gen de la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT H1) era un factor de riesgo para el TE en un estudio de 356 sujetos con TE familiar y esporádico, 61 con atrofia multisistémica y 409 controles (odds ratio de 1.3) (Vilarino-Guell et al., 2011), pero este dato no ha podido ser confirmado en otros estudios (García-Martín et al., 2012; Clark et al., 2014)

Hay otras enfermedades que pueden presentar un temblor postural similar al del TE como la atrofia bulboespinal tipo I (Enfermedad de Kennedy), la ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA-12) o el síndrome temblor/ataxia causado por premutaciones en el gen FMR1 (FXTAS). En ninguna de estas enfermedades se ha podido demostrar una asociación con el TE (Clark et al., 2015). Por otra parte, en algunas neuropatías hereditarias se describe la existencia de un temblor similar al TE y algunos de los genes causantes de estas neuropatías que incluyen la conexina-32 y el gen de la proteína mielínica periférica-22 (PMP22) podrían ser consideradas como potenciales candidatos para el TE (Deng et al., 2007)

La ausencia de una concordancia completa en los estudios genéticos sugiere que los **factores ambientales** podrían jugar también un papel en la patogénesis del temblor (Tanner et al., 2001). El harmane y otros alcaloides del grupo betacarbonil, son capaces de producir temblor en animales de laboratorio (Stanford & Fowler 1998). El harmane está presente en las proteínas animales de la dieta humana y se ha encontrado que los niveles sanguíneos de harmane están más elevados tanto en pacientes con temblor esencial familiar como en los esporádicos (Louis et al., 2010a; Louis et al., 2012b; Louis et al., 2013 d y e). También se han encontrado niveles elevados de harmane en muestras de cerebelo de pacientes con temblor esencial y una correlación entre que las concentraciones de esta sustancia en sangre con una reducción en la ratio N-acetil-aspartato/creatinina total en el cerebelo (Louis et al., 2007b). No se han encontrado otros factores ambientales de riesgo con excepción del plomo (Dogu et al., 2007; Louis et al., 2011c), mientras que la exposición a manganeso y disolventes orgánicos no

se ha asociado con el TE (Louis et al., 2004a).

Aunque hay pocos estudios de la relación de la dieta con el temblor esencial, un estudio ha revelado un menor riesgo de temblor (odds ratio 0.78) en personas con mayor adherencia a la dieta mediterránea (Scarmeas & Louis 2007) y otro que los hombres con más temblor resultaron ser mayores consumidores de carne (Louis et al., 2008b). Hay varios estudios que han estudiado la relación de temblor con los hábitos de consumo de tóxicos o estimulantes con asociaciones variadas, como es el caso de un estudio poblacional que mostró que el consumo de tabaco reducía el riesgo de sufrir temblor esencial (Benito-León et al., 2008), u otro en el que los pacientes con temblor consumían menos café pero cantidades de alcohol similares a la de los controles (Louis et al., 2004b) o que la población mayor de 65 años con historia de consumo moderado a severo de alcohol tenía más riesgo de sufrir temblor cuando los datos se ajustaban por el mayor consumo de cigarrillos en los bebedores (Louis et al., 2009). El significado y validez de todas estas observaciones requiere, sin duda, de más estudios.

Los problemas actuales y las perspectivas en la estrategia de estudio genético del TE.

Aunque los datos disponibles soportan la idea de que la susceptibilidad para sufrir temblor esencial se hereda con un patrón AD, es altamente improbable que exista una única anomalía genética causal. El trabajo del descubrimiento de genes en el TE probablemente se ha visto obstaculizado por la alta tasa de fenocopias, la posibilidad de herencia no Mendeliana, la heterogeneidad de los locus en los casos de TE monogénica y falta de biomarcadores diagnósticos.

Actualmente conocemos que, a través de los mecanismos de procesamiento alternativo, el organismo es capaz de generar, a partir de un único molde genético, decenas de isoformas con funciones radicalmente diferentes o múltiples, en función del contexto o del tipo celular. Este aumento de la complejidad funcional a partir de un número de estructuras moleculares

menos abundantes, ha venido acompañado de la irrupción de la epigenética y sus casi infinitas posibilidades de creación de variaciones a partir de la modulación/regulación del ADN o a través de la aún inconclusa saga de los RNAs no codificantes. El desentrañamiento del sustrato molecular de las enfermedades nos ha aportado nuevos paradigmas mutacionales; así, a las clásicas mutaciones puntuales, duplicaciones, inversiones y deleciones, se añaden las enfermedades por inestabilidad del ADN, el *imprinting* genómico según el sexo del alelo transmisor, los *copy number variation* (variaciones en el número de copias sanas) o los mecanismos de complementación molecular, que contribuyen a comprender las bases de las correlaciones genotipo-fenotipo y a poder establecer algunas predicciones (López de Munain, 2015).

Además, hay que considerar nuestro conocimiento incompleto de las interacciones entre lo genético y lo ambiental, incluyendo dentro de esa interacción la variable del paso del tiempo que actúa acumulando inexorablemente mutaciones somáticas y mitocondriales y que, conjuntamente con la epigenética, son capaces de modificar la biología básica de los organismos. Desde esa perspectiva, resulta difícil diferenciar nítidamente lo que es una verdadera enfermedad genética de lo que es una configuración genética de predisposición a determinados problemas de salud en función del contexto (que incluye a su vez, otros genes y el ambiente en sentido amplio; climático, nutricional, hábitos de vida, etc.).

Desde esta perspectiva y aunque hay que interpretar de forma cautelosa los resultados de ligamiento y de asociación única en el caso del TE, parece posible que mutaciones en alelos de muchos genes diferentes pudieran resultar en un factor de riesgo para el temblor esencial (Kuhlenbaumer et al., 2014). Por desgracia, la mayoría de las enfermedades complejas (aquellas que están determinadas por varios genes y por factores ambientales) no siguen un patrón hereditario mendeliano típico, por lo que los estudios de ligamiento clásicos que se han estudiado hasta ahora no se pueden aplicar. En estos casos hay que acudir a métodos de ligamiento que no requieren ajuste de la muestra a un modelo concreto de herencia, llamados por tanto métodos no-paramétricos o independientes de modelo. Además y dado que los

estudios de ligamiento y de asociación alélica clásicos tienen poca potencia para detectar regiones del genoma responsables de enfermedades complejas (poligénicas y multifactoriales), y merced a los datos proporcionados por el Proyecto Hapmap, en los últimos años se han utilizado tecnologías de genotipado masivo de SNPs (basadas en microarrays) para establecer asociación entre regiones genómicas concretas y la predisposición a sufrir enfermedades comunes con un componente genético demostrado.

La medicina genómica cuenta ahora con las enormes posibilidades de las técnicas de secuenciación masiva (NGS por *Next Generation Sequencing*) que nos ofrecen un gran caudal de información. Sin embargo, es un hecho recurrente que al tratar de encontrar la causa molecular de un trastorno genético mediante un WES/WGS (*whole exome/genome sequencing*, o secuenciación del exoma/genoma completo) nos encontremos con decenas de variantes no repertoriadas, cuyo impacto sobre la función de la proteína o sobre una vía metabólica, descansa en una predicción bioinformática cuya veracidad es difícil de confirmar en la práctica. También es cierto que la aplicación de estos estudios en comparación de genotipos entre pacientes con TE y controles en poblaciones étnicamente diferentes pueden llevar a la identificación de variaciones genómicas enfermedad-específicas o etnicidad-específicas, sin embargo, estas variantes deberían confirmarse o descartarse mediante estudios de expresión funcional en sistemas celulares apropiados.

Además, para poder aplicar estas técnicas de forma rentable, parece necesario: (i) desarrollar y utilizar datos comunes para el fenotipado del TE, como podría ser clasificar los casos de TE en diferentes subtipos en base a si se presentan en forma de un trastorno monosintomático o por el contrario coexisten con otras enfermedades neurológicas, o según su edad de inicio u otras variables, (ii) recoger una muestra suficientemente grande, idealmente de forma prospectiva, que permitiera la realización de estudios de asociación genotipo-fenotipo. Esta recogida de datos clínicos, ADN y otras muestras biológicas de casos esporádicos y familiares de TE podría permitir elucidar el espectro alélico completo y la heredabilidad estimada analizando grandes muestras de TE mediante las nuevas técnicas de secuenciación

masivas (Hopfner et al, 2016).

3.3.4 Patogénesis

La alta prevalencia del TE no resulta sorprendente dada la arquitectura del SNC, en parte organizada en bucles de inhibición recíproca, así como la existencia de conexiones excitatorias tanto a nivel neuronal como a nivel de la red interneuronal lo que finalmente hacen que el SNC sea propenso a producir actividades oscilatorias (Shaikh et al., 2008). En este paradigma, el temblor esencial sería la manifestación de la disfunción de múltiples vías tremorígenas, en ocasiones funcionalmente superpuestas, en las que su función oscilatoria normal estaría aumentada y/o disregulada de forma patológica, lo que se expresaría clínicamente como temblor (Brittain & Brown 2013; Hallett, 2014). Aunque la función exacta de estas oscilaciones es todavía motivo de debate, parecen jugar un importante papel en el control motor central en humanos (Kristeva et al., 2007). La participación de vías cerebelo-tálamo-corticales y olivo-cerebelosas ha sido puesta de manifiesto en múltiples publicaciones (Raethjen & Deuschl 2012), pero el lugar de origen de la actividad oscilatoria y las bases de la transición de las oscilaciones fisiológicas que ocurren durante el control motor normal al temblor patológico siguen siendo desconocidas.

Actualmente hay dos hipótesis radicalmente opuestas para explicar los mecanismos fisiopatológicos del TE: (1) el temblor esencial sería debido a una alteración fisiológica generalizada de la función neuronal (p.e., una oscilación neuronal), lo que produciría el temblor y otras alteraciones sutiles de ciertas funciones neuronales, y (2) los síntomas y signos de temblor esencial serían consecuencia de una neurodegeneración selectiva y primaria del cerebelo.

A continuación, aportamos datos de los múltiples estudios realizados en distintos campos y que pueden aportar luz en esta controversia estructurándolos en tres apartados:

- El estudio de las vías implicadas en la génesis del temblor

- La topografía y la naturaleza de las lesiones estructurales asociadas al TE
- Su fisiopatología molecular

a. El estudio de las vías implicadas en la génesis del temblor. La hipótesis de la red oscilatoria

Cada vez hay más pruebas de que el TE está asociado a un aumento de actividad en el circuito cerebelo-tálamo-cortical, sin embargo, este circuito está implicado en muchas otras formas de temblor y las anomalías específicas que ocurren en el TE son todavía desconocidas. Las neuronas del tálamo, las olivas inferior y posiblemente del cerebelo tienen propiedades eléctricas únicas que les permiten oscilar de forma independiente a una frecuencia dada. Por esta razón, la investigación se ha centrado fundamentalmente en localizar osciladores únicos. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias de que este no es el caso (Raethjen et al., 2000; Pedrosa et al., 2012).

Utilizando una combinación de estudios neurofisiológicos y RMN funcional, se ha podido registrar la manifestación periférica del temblor de forma simultánea a la actividad cerebral relacionada con la generación del mismo. Precisamente, un punto adicional que argumenta en contra de la existencia de un oscilador único en el TE, es el hecho de que la coherencia cortico-muscular se puede perder de forma intermitente sin que se observen cambios en la actividad periférica (Raethjen et al., 2007). Muthuraman et al., utilizando espectros de coherencia del registro EEG en pacientes con TE durante la realización de una tarea, encontraron que las vías cerebrales relacionadas con el temblor podrían ser distintas en los casos de temblor esencial de inicio temprano frente a los de inicio tardío, sugiriendo que podrían existir diferencias fisiopatológicas entre ambos (Muthuraman, 2015). Además, los estudios mediante estimulación profunda en pacientes con TE y EP de predominio tremórico han demostrado que múltiples grupos celulares talámicos (*clusters*) que están espacialmente separados entre sí, están involucrados en la generación del temblor (Pedrosa et al., 2012). En consecuencia, la

investigación se desplazó desde la hipótesis del “oscilador único” hacia el estudio de la dinámica de la red cerebelo-tálamo-cortical, concretamente a la intensidad y direccionalidad de la conectividad interregional (Govert et al., 2016).

Desde hace tiempo conocemos que lesiones vasculares en el córtex frontal, putamen, corona radiata, tálamo, protuberancia y cerebelo son capaces de reducir el temblor contralateral de la misma forma que lo hace la estimulación profunda cerebral en el tálamo ventrolateral y en el subtálamo (Kim et al., 2006; Dupuis et al., 2010; Lim et al., 2010). Es interesante apuntar que esto no ocurre en las lesiones en la oliva inferior. También se conoce que el temblor se suprime tras la ablación o la microinyección de muscimol en el VIM (Pahapill et al., 1999) y que su presencia se correlaciona con las descargas que se registran en el tálamo ventrolateral y con el aumento en la ritmicidad cortical (Hellwig et al., 2001; Hua & Lenz 2005).

Estudios más recientes han demostrado anomalías estructurales, metabólicas y funcionales en regiones del cerebelo en pacientes con TE. Por ejemplo, estudios con RMN utilizando DTI han confirmado la implicación de los pedúnculos cerebelosos inferiores (Klein et al., 2011) y la existencia de alteraciones en el núcleo dentado (Nicoletti, 2010). Utilizando técnicas de imagen de RMNf intraoperatoria, se aprecia que la estimulación talámica provoca la activación de todos los nodos ya conocidos del circuito: córtex sensitivomotor, tálamo, corteza cerebelosa contralateral y núcleos cerebrales profundo y a la vez que muestra una correlación significativa con la efectividad terapéutica a largo plazo, sugieren que la estimulación profunda ejerce sus efectos mediante la modulación de los circuitos olivo-cerebelosos y tálamo-corticales (Gibson et al., 2016). Estudiando casos de TE con y sin temblor de reposo mediante análisis VBM y RMN funcional durante la ejecución de escritura de forma continua, los resultados obtenidos apoyan la asociación de una disfunción de vías cerebelo-tálamo-corticales y una disfunción añadida en el pálido interno (GPi) en los pacientes con TE y temblor de reposo en ausencia de otros cambios morfométricos, sugiriendo que el GPi está implicado en este tipo de temblor (Nicoletti, 2015). Cuando la tarea es la realización del *tapping* se aprecia un aumento

de activación del núcleo dentado que correlaciona con la severidad del temblor (Buijink, 2015). En estudios electrofisiológicos previos se había demostrado el carácter oscilatorio rítmico de las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos y que dicha actividad estaría bajo control de los inputs inhibitorios gabaérgicos tónicos procedentes de las células de Purkinje (Mouginot et al., 1996; Uusisaari y Knöpfel, 2008). La tomografía por emisión de positrones ha revelado un aumento de la unión del ¹¹C-flumazenil a los receptores GABA-A en el tálamo ventrolateral, el núcleo dentado del cerebelo y la corteza premotora en TE (Boecker et al., 2010).

Todos estos hallazgos sugieren que la actividad cerebelo-dentato-talámica y la conectividad cerebelo-cortical están alteradas en el TE, lo que, en opinión de algunos autores, podría estar en relación con los cambios funcionales descritos en el cerebelo de los pacientes con TE. Buijink et al, demostraron mediante un análisis de conectividad un efecto modulador de la variación del temblor sobre la conexión cerebelo-dentato-talámica y sobre la actividad intrínseca del tálamo y del cerebelo (lóbulo V). De forma similar a estudios previos encontraron una disminución de la conectividad funcional cerebelo-cortical relacionada con la realización de tarea motora. Curiosamente, la disminución del acoplamiento funcional entre la corteza motora primaria y el cerebelo posterior se asoció con un aumento en la severidad del temblor, y el aumento de la intensidad del temblor se asociaba con mayor conectividad funcional entre los lóbulos cerebelosos I-IV y el tálamo motor. Es decir, la actividad de salida en el cerebelo alterada generaría una inadecuada actividad talámica, lo que sería capaz de interrumpir la conectividad fisiológica con la corteza motora (Buijink et al., 2015). Estos datos son congruentes con los hallazgos del estudio de coherencia entre EEG-EMG ya mencionado (Raethjen et al., 2007), en el que se demostraba que se puede perder la actividad cortical de forma intermitente sin que se observen cambios en el temblor sugiriendo que la afectación cortical no es crucial en la génesis del temblor. Los resultados de Buijink apoyan la hipótesis de que el aumento en la gravedad del temblor altera de forma proporcional la conectividad cerebelocortical vía el tálamo mediante la amplificación de la inhibición cortical.

Considerando otras alternativas, es cierto que se ha descrito que la ritmicidad en el

sistema olivo-cerebeloso estaría afectada por la acción de los canales del calcio tipo T. El canal Ca (V) 3.1 es el subtipo dominante en la oliva inferior (Handforth, 2010). En estudios realizados en modelos animales, en los ratones transgénicos que carecían de los canales Ca (V) 3.1 no se produjeron descargas sincronas de 4 a 10 Hz en la oliva inferior después de la administración de harmalina, a diferencia de lo que ocurría en los ratones controles (Park, 2010). Sin embargo, en un estudio *postmortem* de 14 casos de TE y 15 controles, no se encontraron anomalías metabólicas ni estructurales en la oliva inferior en los pacientes con TE, lo que iría en contra de una potencial localización del origen de la actividad oscilatoria en la oliva inferior (Louis et al., 2013a). Aparte del estudio PET realizado por Hallett, (Hallett et al., 1993) que encontró posibles anomalías en la oliva inferior, la evidencia encontrada en humanos de que el TE sea consecuencia de una disfunción de la oliva inferior es baja.

b. La topografía y la naturaleza de las lesiones estructurales asociadas al TE

A continuación, revisaremos las aportaciones de los estudios anatomopatológicos, de neuroimagen y de comorbilidad en el estudio de la topografía y la naturaleza lesional asociadas al TE.

Estudios anatomopatológicos

Aunque la razón de la existencia de la actividad oscilatoria sigue siendo desconocida, hay evidencia de que el cerebelo es un actor clave en la fisiopatología del temblor esencial y junto al tálamo la principal región anatómica implicada en la génesis del mismo. Los estudios anatomopatológicos en pacientes con TE han aumentado de forma notable en los últimos 10 años en un intento de aportar evidencias sobre la naturaleza de las alteraciones estructurales que presentan estos pacientes y aclarar así sus bases etiofisiopatológicas.

En un estudio de 19 casos publicado en 2004 no se encontraron anomalías microscópicas en los cerebros de pacientes con TE (Rajput et al., 2004). Sin embargo, posteriormente se han descrito ciertas alteraciones cerebelosas específicas como son la

pérdida de células de Purkinje, la presencia de patología axonal (“torpedos axonales”), la presencia de gliosis o la apariencia densa y enmarañada (“peluda”) de las células canasta en el córtex cerebeloso (Deuschl, 2009; Erickson-Davis, 2010). Louis et al., comunicaron que los pacientes con TE tendían a agruparse en dos grupos: unos con cuerpos de Lewy mesencefálicos (aproximadamente un 25 %) y otros sin cuerpos de Lewy (aproximadamente un 75%). Aquellos que no tenían cuerpos de Lewy mostraban un menor número de células de Purkinje y patología relacionada en la corteza cerebelosa, mientras que los que tenían cuerpos de Lewy mostraban dichos cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy en los núcleos pigmentados mesencefálicos, particularmente en el locus ceruleus, origen de proyecciones noradrenérgicas a las células de Purkinje del cerebelo (Louis 2009a; Louis et al., 2011b; 2012a; 2012c; 2012d; 2013c). Sin embargo, Shill et al., no encontraron un aumento en la prevalencia de cuerpos de Lewy en casos de TE, pero sí una alta prevalencia de comorbilidad neurológica tanto en pacientes como en controles (Shill et al., 2008; 2016). Tampoco Rajput et al., encontraron diferencias significativas en el número de células de Purkinje en la evaluación patológica de 12 casos de TE comparados con 6 controles y 41 casos de enfermedad de Parkinson (Rajput et al., 2012a; 2012b). Hay que añadir que los cuerpos de Lewy, torpedos axonales y la pérdida de células de Purkinje son hallazgos incidentales comunes en sujetos controles añosos, por lo que, aunque estos cambios aparecen de forma cuantitativamente mayor en sujetos con TE en estos estudios, estos hallazgos podrían no ser específicos para el TE. Tampoco otros grupos encontraron correlación alguna entre en el número de células de Purkinje y la duración del TE (Jellinger, 2014; Symanski et al., 2014).

Recientemente, el catálogo de los hallazgos patológicos específicos en el TE se ha ampliado con la descripción de diferencias en múltiples medidas de la morfología de las células de Purkinje en cerebros de pacientes con TE frente a los de controles (Yu et al., 2012; Babij et al., 2013). También se ha observado, en los casos de TE, una disminución en la densidad sináptica y una alteración en la distribución topográfica de las sinapsis entre las fibras trepadoras (*climbing fibers*) y las células de Purkinje. Estas fibras constituyen una importante

entrada excitatoria al cerebelo y los hallazgos descritos correlacionan inversamente con la intensidad del temblor (Lin et al., 2014). Otro estudio mostró que los pacientes con TE tenían una mayor acumulación de proteína tau hiperfosforilada que los controles, los autores, aunque reconocen que el TE no es una taupatía, proponen que el TE puede predisponer a la acumulación de agregados celulares de tau, lo que podría estar en relación con el deterioro cognitivo que acompaña a algunos casos de TE (Pan, 2014).

También es posible que la patología cerebelosa observada en el TE fuera consecuencia de la persistencia del temblor en el tiempo más que su causa (Deuschl & Elble 2009). Un estudio anatomopatológico reciente encontró un aumento de la proteína LINGO1 en el córtex cerebeloso de pacientes con TE comparado con controles, así como un aumento de la tinción inmunohistoquímica para LINGO1 en las células “canasta” anormales en el cerebelo (Kuo et al., 2013). Los hallazgos en LINGO1 son de interés, dado que está descrito un aumento del riesgo de sufrir TE asociado a mutaciones de LINGO1. Estos hallazgos se han observado también en otro estudio posterior, aunque en este caso el aumento de LINGO1 en la sustancia blanca del cerebelo se objetivó tanto en casos de pacientes con TE como en el subgrupo de pacientes con EP en comparación con controles, lo que podría orientar a la existencia de una reacción común en respuesta al temblor más que a una patología cerebelosa específica (Delay et al., 2014). En sentido contrario se postulan los resultados de un estudio reciente en el que muestran que las alteraciones patológicas encontradas son similares en los casos de TE de inicio precoz y los de inicio tardío con lo que sugieren que no representan entidades clínico-patológicas distintas (Kuo et al., 2016).

Resumiendo, los estudios neuropatológicos en TE se han centrado principalmente en cerebelo y tronco cerebral (incluyendo la oliva inferior y locus coeruleus) con desacuerdo manifiesto de si efectivamente hay datos de neurodegeneración. Uno de los grupos que han estudiado la neuropatología en el TE se ha centrado en los estudios cuantitativos que utilizan una sección estandarizada de neocerebelo parasagital (lóbulos cuadrangulares anterior y posterior en el lóbulo anterior de la corteza cerebelosa: lóbulos IV-VI) que están implicados en

el control motor. Este grupo ha observado cambios estructurales en las células de Purkinje y neuronas vecinas, así como una reducción en la densidad lineal de células de Purkinje y heterotopías de células de Purkinje. Por el contrario, otros dos grupos no han detectado una reducción en las células de Purkinje en ET. Además de los cambios en el número de células de Purkinje, el primer grupo ha definido una serie de cambios en la arquitectura dendrítica, axonal y sináptica del cerebelo, que no han sido examinados por los otros investigadores.

El significado de todos estos cambios microscópicos no está todavía claro y ha sido motivo de un debate acalorado durante los últimos años (Bonuccelli, 2012; Kurtis, 2012; Louis et al., 2012a; Rajput et al., 2012a, 2012b, 2013). Las inconsistencias observadas entre estudios en lo que respecta al grado de pérdida de células de Purkinje y neuronas del núcleo dentado podrían ser consecuencia de diferencias metodológicas tanto en la preparación de los especímenes para el estudio patológico como de la dependencia del fenotipo clínico sin el beneficio de genotipado en el diagnóstico de los casos estudiados (Jellinger, 2014). Además, la correlación entre los hallazgos neuropatológicos y la sintomatología clínica puede ser compleja y aún no se ha dilucidado en el TE. La cartografía de la carga lesional en relación con la somatotopía neuroanatómica es uno de los déficits críticos en los estudios reportados. La observación que más se acerca a abordar la cuestión de si los cambios morfológicos se alinean con el fenotipo de la enfermedad proviene del estudio de un pequeño número de casos con temblor asimétrico en los que se observó la existencia de una correlación razonable entre el lado del temblor y la mayor carga de los cambios estructurales (Louis et al., 2014b). Además, como sucede en otras enfermedades neurológicas, la información neuropatológica se obtiene únicamente de la autopsia y el estudio la neuropatología de las enfermedades sólo en el punto final complica la interpretación de los eventos que son capaces de iniciar la enfermedad, los modifican su progresión y la condicionan su heterogeneidad. En el estudio de otras enfermedades, se han requerido un gran número de casos representativos de una amplia gama de estadios clínicos (como en el estadiaje de Braak en la EP), cosa que parece difícil de que se pueda conseguir en el caso del TE.

Según las conclusiones de la reunión celebrada en mayo de 2015 por la *National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health (USA)* sobre TE, los objetivos de definir los cambios neuropatológicos asociados con ET serían (1) complementar y apoyar los estudios fisiológicos, (2) comprender los procesos celulares asociados con la lesión celular y su progresión con el objeto de desarrollar tratamientos, (3) identificar endofenotipos patológicos que pueden permitir el reconocimiento de distintas variantes genéticas o clínicas, y (4) definir las relaciones con otras formas de neurodegeneración (Hopfner et al, 2016).

Las recomendaciones de consenso incluyen (i) desarrollar métodos estandarizados para el examen macroscópico y microscópico (ii) utilizar criterios de selección y documentación clínica estandarizados para la recogida, el intercambio y el análisis de tejidos post mortem de pacientes y controles. (iii) recopilar de forma prospectiva datos fenotípicos y patológicos que permitan correlaciones clínico-patológicas (Hopfner et al, 2016).

Estudios de neuroimagen

Los resultados de los estudios de neuroimagen realizados en pacientes con TE no han ofrecido luz a este debate. En teoría, los estudios con RMN funcional podrían detectar un amplio espectro de alteraciones anatómicas, los estados funcionales asociados al temblor y deberían ser sensibles a los cambios producidos tanto por el propio temblor como por los cambios compensatorios secundarios. Sin embargo, el problema se presenta porque ambos fenómenos (temblor y cambios compensatorios) ocurren de forma simultánea lo que dificulta su separación durante el análisis. Aunque en conjunto los estudios con RMNf confirman que el cerebelo está afectado en los pacientes con TE y que las áreas motoras corticales forman parte de la red neuronal tremorígena, no se aportan datos concluyentes que ayuden a dilucidar la naturaleza de los cambios observados, pudiendo estos ser interpretados de forma variable, lo que permite argumentar que muestran bien neurodegeneración o bien disregulación de las vías cerebelo-corticales sin neurodegeneración, dependiendo de la modalidad de imagen utilizada

(Bhalsing et al., 2013; Louis et al., 2014).

Utilizando morfometría basada en voxels (VBM), Quattrone et al., encontraron una reducción del volumen del vermis cerebeloso estadísticamente significativa en pacientes con temblor cefálico, pero no en aquellos que mostraban temblor sólo en extremidades (Quattrone et al., 2008). Sin embargo, más recientemente y comparando los hallazgos RMN en pacientes con TE una vez estratificados en subtipos en base a la presencia o no de signos cerebelosos en la exploración, se encontró que el volumen de varios segmentos adyacentes al vermis cerebeloso estaba reducido en pacientes con TE, siendo este efecto más prominente en el subgrupo de pacientes con signos clínicos de disfunción cerebelosa (Shin et al., 2015). También los estudios con RMNf en reposo muestran una disminución en la homogeneidad regional de forma bilateral en los lóbulos cerebelosos anteriores y posteriores, en el tálamo bilateral e ínsula además de un aumento de la homogeneidad regional en múltiples áreas corticales; correlacionando los valores en el cerebelo y en el córtex motor primario con la severidad del temblor (Fang et al., 2013). Estos resultados se han confirmado en un estudio más reciente realizados con metodología similar (Yin et al., 2016). Por su parte Gallea et al., encontraron cambios opuestos en áreas corticales y cerebelosas. El cerebelo mostraba una disminución en el volumen de la sustancia gris que correlacionaba de forma positiva con la frecuencia del temblor, mientras que el área motora suplementaria mostraba un aumento de tamaño correlacionado negativamente con el volumen del cerebelo y la frecuencia del temblor, pero de forma positiva con la intensidad del temblor y la duración de la enfermedad (Gallea et al., 2015). Según estos hallazgos, existiría un defecto cerebeloso primario responsable de la generación de un oscilador del que dependería la frecuencia del temblor, mientras que la manifestación clínica del temblor sería dependiente de la excitabilidad cortical.

Mediante un análisis de DTI, Shin et al., encontraron pequeñas reducciones en los valores de anisotropía fraccional en el cerebelo bilateral, lado derecho de la protuberancia, área retrorubral izquierda y sustancia blanca cerebral profunda (Shin et al., 2008). Nicoletti et al., encontraron una reducción de la anisotropía fraccional sólo en la vecindad del núcleo dentado,

alteración que correlacionaba con la duración de la enfermedad, pero no con la severidad del temblor (Nicoletti et al., 2010). Jia et al., confirmaron la existencia de estas alteraciones cerca del núcleo rojo, pero no en el estriado, tálamo o sustancia negra (Jia et al., 2011). Otros estudios con DTI no encontraron cambios en la anisotropía fraccional, pero sí en la difusividad en varias regiones cerebrales o cerebelosas (Saini et al., 2012) o no encontraron ninguna alteración significativa (Buijink et al., 2013).

Los estudios con espectroscopia han mostrado una disminución en la ratio N-acetyl-L-aspartato/creatina en el córtex cerebeloso, dato consistente con pérdida neuronal (Louis et al., 2002a; Pagan et al., 2003). Curiosamente, se encontró una asociación inversa entre la ratio NAA/CR cerebeloso-cortical y la gravedad del temblor lo que, en opinión de los autores, sugeriría que se trata de una enfermedad neurodegenerativa progresiva (Louis et al., 2002a). También se ha descrito un aumento del depósito de hierro en casos de TE versus controles en el núcleo dentado derecho, pálido bilateral y sustancia negra, apuntando a la existencia de patología neurodegenerativa (Novellino et al., 2013).

Por su parte, los estudios de imagen del flujo sanguíneo y oxigenación cerebral en TE implican de forma consistente tanto al cerebelo como a áreas corticales, aunque con resultados variables. Estudios funcionales con RMN muestran un aumento de actividad en ambos hemisferios cerebelosos, núcleo dentado y núcleo rojo ipsilaterales al temblor y de forma contralateral en el pálido, tálamo y córtex primario sensitivo-motor, mientras que estudios con PET han revelado un aumento de la utilización de glucosa de forma bilateral en las olivas, cerebelo, núcleo rojo y tálamo (Boecker & Brooks, 1998). En un estudio de RMN funcional tarea-dependiente, se observó un aumento en la actividad en el área motora suplementaria y córtex motor con una disminución en la actividad en los lóbulos cerebelosos (Neely et al., 2014), mientras que en otro estudio de PET realizado con F-18-fluorodeoxiglucosa (F-18-FDG-PET), se objetivó que no existían cambios en el metabolismo de la glucosa en el cerebelo en sujetos con TE en situación de reposo, pero sí en los lóbulos medial frontal, temporal medial y parietal, sugiriendo que los síntomas motores serían consecuencia de alteraciones electrofisiológicas en

vías cerebelo-tálamo-corticales más que por la existencia de un proceso neurodegenerativo (Ha et al., 2015). Sin embargo, en un estudio con EMG-fMRI simultánea realizado con el objetivo de identificar las áreas cerebrales activadas que estaban asociadas de forma específica con las variaciones en la intensidad del temblor en pacientes con TE según la técnica previamente utilizada en el estudio de familias con mioclono cortical y temblor (Contarino et al., 2012), se identificaron varias áreas cerebelosas específicas bilaterales asociadas al TE: en concreto los lóbulos V, VI y VII (Broersma et al., 2015). Los autores discuten el hallazgo de la hiperactividad en el cerebelo mostrada en su trabajo dentro de los mismos parámetros de incertidumbre previamente descritos: por un lado, interpretan que las áreas afectadas son deficientes y desorganizadas, lo que las haría menos eficientes, y esta ineficiencia induciría el aumento de activación observada, pero reconocen que esta hiperactividad cerebelosa podría ser secundaria y compensatoria a otro defecto en la vía cerebelo-tálamo-cortical.

Todas las hipótesis que se han enunciado en base a estos estudios necesitarían ser testadas con estudios longitudinales que combinen estudios electrofisiológicos y de RMNf.

Estudios de comorbilidad

Aunque sigue siendo un tema de debate, no hay ninguna evidencia incontestable que sugiera una relación fisiopatológica entre el temblor esencial y otras enfermedades neurológicas. Por el contrario, muchos de los datos epidemiológicos clínicos, genéticos, neuropatológicos y de neuroimagen disponibles sugieren que el TE tiene una fisiopatología distinta (Jankovic, 2002; Elble et al., 2007; Deuschl & Elble, 2009; Quinn et al., 2011; Rajput et al., 2012a; Elble et al., 2013a; Louis & Ottman, 2013f).

Mucha de la información epidemiológica disponible deriva de estudios de base poblacional, pero la mayoría de ellos han sido realizados en sujetos mayores de 65 años lo que podría sesgar los resultados de los mismos, al sugerir que el TE se comporta como una enfermedad neurodegenerativa. Así, en una revisión sobre los resultados de un estudio

poblacional realizado en España (NEDICES), se aprecia que los casos de TE con una edad de inicio mayor de 65 años, presentaron una mayor prevalencia y una incidencia de demencia que fue el doble que la de los controles (Romero et al., 2012). En un estudio del mismo grupo, en el que se realizó un seguimiento de los pacientes durante 3 años, se confirmó la existencia de deterioro cognitivo de evolución más rápida en los casos de TE en comparación con los controles (Benito-León et al., 2013). El análisis de los datos epidemiológicos y estudios anatomopatológicos *postmortem* sugieren también que el ritmo de evolución es más rápido y hay una mayor atrofia cerebelosa en los pacientes con TE de inicio tardío (Louis et al., 2009b). Algunos autores interpretan que es improbable que la disfunción cerebelosa, per se, pueda explicar la demencia asociada al TE dado que los déficits cognitivos descritos en otros pacientes con lesiones cerebelosas son generalmente ligeros y tomados en conjunto todos estos datos apoyarían la hipótesis neurodegenerativa del TE (Louis et al., 2000; Benito-León & Labiano-Fontcuberta, 2015), mientras que para otros autores, tanto el envejecimiento normal como la comorbilidad asociada a la edad podrían contribuir a una progresión más rápida del temblor y a la existencia de síntomas cognitivos asociados (Elble, 1995; Elble et al., 2007a; Deuschl & Elble, 2009).

El caso particular de la posible relación entre el TE y la enfermedad de Parkinson ha sido profusamente revisado en la literatura (Minen & Louis, 2008, Fekete & Jankovic, 2011; Quinn, 2011; Thenganatt & Louis, 2012b; Thenganatt, 2016). En los estudios epidemiológicos se acumulan las evidencias de que el TE es significativamente más frecuente en pacientes con enfermedad de Parkinson (5.9%) que en otras enfermedades (1%) o controles (0.5%) (Tan et al., 2008). Estos hallazgos concuerdan con los estudios epidemiológicos realizados mediante encuesta que sugieren que la EP y el TE pueden compartir factores de susceptibilidad familiar (Rocca et al., 2007).

Para algunos autores, y dado que el TE es común en la población general (aproximadamente un 5% en sujetos mayores de 65 años), esta relación entre ambas entidades podría ser casual tal y como se ha descrito en otras enfermedades neurológicas

como, por ejemplo, en la demencia por cuerpos de Lewy, la distonía, migraña (Barbanti et al., 2010), o la neuropatía periférica (Brin & Koller 1998). En línea con esta hipótesis, hay autores que consideran que las características clínicas del TE no son completamente específicas por lo que un temblor de características similares al del TE puede encontrarse en pacientes con EP (Pellecchia et al., 2007) o con distonía (Schiebler et al., 2011), complicando la interpretación de los datos epidemiológicos en relación al riesgo de sufrir un TE u otras enfermedades neurodegenerativas. No obstante, según Adler, un subtipo de estos pacientes podría manifestarse con una combinación de TE de larga evolución y una EP de inicio posterior (TE-EP), mientras que otros presentarían TE y signos de parkinsonismo cuyo sustrato patológico podría ser distinto al de la enfermedad de Parkinson (Adler et al., 2011). Esta superposición en los fenotipos, los sesgos de selección y la dificultad que presenta el realizar un diagnóstico de certeza, incluso por parte de especialistas en los trastornos del movimiento (Quinn et al., 2011), dificultan doblemente la interpretación de los resultados de los estudios epidemiológicos.

Sin embargo, otros autores opinan justo lo contrario y encuentran datos que inclinan la balanza hacia una relación etiofisiopatológica entre el TE y la EP. En un estudio realizado mediante encuesta, unos pacientes con TE y otros con EP describían la existencia de historia familiar tanto de TE como de EP, significativamente más frecuente que en los controles lo que sugeriría una coagregación familiar entre TE y EP (Louis, 2016b). El trastorno de sueño REM, cuya incidencia está aumentada en los pacientes con enfermedad de Parkinson, también se ha encontrado presente en el TE (Lacerte et al., 2014). Aunque el estudio de imagen del transportador de dopamina (DAT) es normal en el TE, algunos estudios han encontrado pequeños déficits dopaminérgicos en pacientes con TE cuando se comparan con los controles. En un estudio realizado con 18F FP-CIT en pacientes con temblor postural bilateral y temblor de reposo uni o bilateral se encontró una actividad nigroestriatal reducida en un 22% de los sujetos (You et al., 2013). Sin embargo, en un estudio reciente en el que se han analizado datos clínicos y de DAT en pacientes de TE con y sin parkinsonismo asociado, los pacientes del grupo TE+EP presentaron ratios más bajas de captación estriatal y también se encontró

una tendencia a una disminución en la captación en los casos de TE, aunque con un patrón diferente (hipocaptación en el núcleo caudado) sin que se observara ninguna correlación entre el resultado del DAT y la severidad o duración del temblor. Los autores concluyen que los pacientes con TE y parkinsonismo representan un grupo heterogéneo que incluye pacientes con TE+EP y pacientes con TE y parkinsonismo. Este último grupo presenta algunos síntomas comunes a la EP, pero no tendrían déficit dopaminérgico en el DAT (Waln et al., 2015).

Otro argumento de peso en la discusión sobre la naturaleza neurodegenerativa del TE ha sido la presencia de signos cerebelosos como el temblor intencional, las alteraciones en la estabilidad y en la marcha, disartria y alteraciones oculomotoras en algunos pacientes, lo que sugiere, que por lo menos en algunos de ellos, hay una cierta anormalidad en el cerebelo o sus vías, hecho que en ocasiones han sido interpretadas como una evidencia de la existencia de una degeneración cerebelosa (Singer et al., 1994; Hubble et al., 1997; Stolze et al., 2001; Klebe et al., 2005; Hoskovcova et al., 2013). Sin embargo, Klebe et al., mostraron que la administración de etanol oral, era capaz de mejorar tanto el temblor intencional como la marcha en tándem en pacientes con TE (Klebe et al., 2005), lo que sugeriría que estos signos cerebelosos son reversibles y no el resultado de un proceso neurodegenerativo. De forma similar, el condicionamiento del reflejo de parpadeo (*blink reflex*) que es un paradigma de aprendizaje motor que requiere del normal funcionamiento de las vías olivo-cerebelosas, está alterado en el TE, pero se normaliza tras la estimulación talámica (Kronenbuerger et al., 2007, 2008), sugiriendo también una reversibilidad sustancial de la disfunción olivo-cerebelosa. La estimulación del *nucleus ventralis intermedius* talámico (VIM) corrige la alteración de la marcha en tándem en pacientes con TE avanzado y también reduce la gran variabilidad de los parámetros cinemáticos de la marcha que se observan en estos pacientes (Fasano et al., 2010, 2012).

c. Fisiopatología molecular y bases neuroquímicas

Los estudios neuroquímicos también muestran una consistente evidencia sobre la participación del cerebelo en la fisiopatología del TE. Hay muchos datos que sugieren que la inhibición neuronal mediada por GABA está alterada y juega un importante papel en la tremorogénesis. Esto ha permitido elaborar la principal teoría que existe en la actualidad sobre la fisiopatología del TE esencial, denominada “hipótesis GABA”. Según esta hipótesis el temblor sería consecuencia de la hiperactividad de los circuitos cerebelo-talámicos debido a la disminución de la actividad GABAérgica (Boecker, 2010; Helmich et al., 2013).

En 1996, Mally et al encontraron niveles reducidos de GABA en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con TE comparados con controles (Mally et al., 1996). Los estudios en modelo de ratón knock-out de la subunidad alfa-1 del receptor GABA-A, mostraron que estos ratones presentaban un temblor de características similares al TE y la administración de fármacos como primidona, propranolol, gabapentina y alcohol eran capaces de producir una disminución del temblor (Kralic et al., 2005). Paris-Robidas et al., en un estudio *postmortem* en pacientes con TE, señalan la existencia de una reducción del 20- 35% de receptores GABA-A y GABA-B en el núcleo dentado (Paris-Robidas et al., 2012) e hipotetizan que una reducción en la inhibición de los núcleos cerebelosos sería capaz de promover una oscilación tremorígena en las vías cerebelo-talámicas. En este mismo sentido, estudios realizados con PET con [11C]flumacénilo han mostrado diferencias en la unión en el receptor GABA en los casos de TE comparados con controles (Boecker, 2010), correlacionando incluso el nivel de captación del ligando para el receptor GABA con la severidad del temblor (Gironell et al., 2012) lo que implicaría la existencia de una disfunción GABA progresiva en estos casos. Shil et al., también encontraron evidencias de una inervación GABAérgica reducida en el *locus ceruleus* (Shill et al., 2012).

Otro de los argumentos utilizados para involucrar al sistema GABA en la fisiopatología del temblor esencial es el efecto antitremórico demostrado por algunos fármacos con actividad gabaérgica. Fármacos con acción directa como el muscimol, gabapentina, topiramato,

pregabalina o indirecta como los barbitúricos, benzodiazepinas, etanol y el propranolol han demostrado su capacidad para mejorar parcialmente el TE, aunque también es cierto que no todos los fármacos con actividad gabaérgica cerebral, como la prograbida y la tiagabina, han demostrado eficacia antitremórica en el TE (Gironell & Marin-Lahoz, 2016).

Sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado ninguna evidencia de la existencia una asociación entre variantes en el receptor GABA con sus genes transportadores, en pacientes con TE (Deng et al., 2006; Thier et al., 2011; García-Martin et al., 2011; Testa 2013; Kuhlenbaumer et al., 2014). Recientemente, se ha descrito una mutación patogénica FUS-Q290X en una gran familia afectada por TE y aunque el mecanismo fisiopatológico subyacente es desconocido, en un interesante trabajo en *Drosophila* transgénica para hFUS-Q290X, Tio y cols encontraron que la expresión de hFUSQ290X en las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas no produjo una degeneración neuronal evidente, pero provocó un déficit motor que se acompañaba de disfunción en el sistema GABAérgico. Curiosamente la sobreexpresión de hFUS-Q290X también producía un aumento de los niveles de serotonina y un incremento en la longevidad de las moscas que iba acompañada de regulación a la baja de la vía de señalización IIS/TOR de la subfamilia (FOXO), uno de cuyos miembros, el genotipo FOXO3A, ha sido también asociado con longevidad en humanos (Tio et al.,2016).

Un resumen de la hipótesis GABA en cuatro pasos (Gironell & Marin-Lahoz, 2016), sería:

Paso 1. Neurodegeneración de la corteza cerebelosa con pérdida de células de Purkinje.

Paso 2. Disminución de la actividad del GABA en las neuronas cerebelosas profundas con actividad oscilatoria rítmica.

Paso 3. Desinhibición del *output* talámico de las neuronas cerebelosas profundas con actividad oscilatoria-rítmica (marcapasos).

Paso 4. Aumento de la actividad rítmica del tálamo y del circuito tálamo-cortical, que comportaría la aparición clínica de temblor.

Además, dentro de las alteraciones neuroquímicas descritas en el TE se conoce la

existencia de alteraciones de otros neurotransmisores como el glutamato, noradrenalina, serotonina, adenosina y la disfunción de canales iónicos que, aunque peor descritos y con resultados en ocasiones inconsistentes, muestran que dentro del espectro de las alteraciones bioquímicas observadas en el TE se produce un desequilibrio que consiste, interpretado globalmente, en un aumento de los neurotransmisores excitadores y una disminución de los neurotransmisores inhibidores (Marin-Lahoz & Gironell, 2016). Por ejemplo, los estudios de asociación GWAS han revelado una relación entre el TE y el gen SLC1A2, que codifica el transportador de aminoácidos excitadores tipo 2 (EAAT2). Cuantifican los niveles de EAAT2 y EAAT1 en el núcleo dentado del cerebelo y la corteza cerebelosa de los casos TE versus controles ha observado que la expresión de EAAT2 se potencia en el núcleo dentado ET, en contraste con los niveles EAAT2 diferencialmente reducidos en la corteza cerebelosa en los sujetos con TE, lo que podría reflejar la existencia de un mecanismo compensatorio para mantener el equilibrio excitación-inhibición en los núcleos cerebelosos (Wang et al., 2016)

3.3.5 Epidemiología

La prevalencia estimada para el TE confirma que esta enfermedad es muy frecuente. De hecho, se le reconoce como el trastorno del movimiento más frecuente en adultos. De acuerdo con los resultados de los diferentes estudios comunitarios realizados, aunque limitadas en su validez externa por la significativa heterogeneidad existente entre los estudios, las cifras de prevalencia del TE varían desde los 4 a los 39 casos por 1000 habitantes (Dogu et al., 2003, Louis & Ferreira, 2010a). La edad es claramente un factor de riesgo para el TE y la mayoría de los estudios muestran un marcado aumento en la prevalencia asociada a la edad. El temblor esencial puede comenzar a manifestarse desde la infancia, pero su incidencia y prevalencia aumentan con la edad (Louis et al., 2001b; Tan et al., 2006). Hay una distribución bimodal en la edad de inicio, con picos en la edad de inicio en la segunda y sexta décadas de vida (Bain et al., 1994; Louis y Dogu 2007b). Aproximadamente entre un 5-15% de los casos de TE tienen un

inicio juvenil. Este inicio temprano es más frecuente en varones y el que exista una historia familiar de temblor (Tan et al., 2006; Louis et al., 2005b). Finalmente, más de un 5% de la población mayor de 65 años tiene temblor esencial (Louis & Ferreira, 2010), aunque en algunas poblaciones la prevalencia es algo menor (Inzelberg et al., 2006; Aharon-Peretz et al., 2012; Ozel et al., 2013).

La incidencia anual en este mismo grupo de edad es de aproximadamente 616 por 100.000 personas/año (Benito-León et al., 2005). En los estudios publicados entre 2001-2010, se aprecia un discreto aumento del TE en varones, lo que para algunos autores podría tener que ver con una asociación epidemiológica con la EP, una enfermedad en la que hay un patrón de mayor prevalencia entre los varones (Louis & Ferreira, 2010). Los estudios interracializados han mostrado la existencia de TE en todos los grupos étnicos (Louis et al., 1995; Tan et al., 2005). En los casos de TE se recoge una historia de temblor en familiares de primer grado en un 60% de los casos y cuando la historia familiar está adecuadamente documentada, generalmente muestra un patrón de herencia autosómica dominante (Bain et al., 1994; Lorenz et al., 2004). Más del 70% de los casos de TE en la población general no están diagnosticados a pesar de que muchos de ellos presentan algún grado de repercusión funcional, además de una mayor tendencia a sufrir trastornos psiquiátricos, como depresión o ansiedad (Benito-León et al., 2005; Dogu et al., 2005; Lorenz et al., 2011).

La variabilidad en los criterios diagnósticos utilizados, la falta de test diagnósticos con suficiente sensibilidad y especificidad y los múltiples sesgos metodológicos observados en los estudios publicados, hacen que las cifras de prevalencia y de incidencia ofrecidas sean tan diferentes (Louis & Ferreira, 2010). Es probable que las estimaciones en los datos epidemiológicos del TE cambien a medida que se implementen las modificaciones que se vayan realizando en la definición y en los criterios diagnósticos del TE.

3.3.6 Metodología del estudio de temblor esencial

Todos los estudios, teorías e hipótesis etiofisiopatológicas enunciadas pivotan sobre un

correcto diagnóstico del TE. El diagnóstico del temblor y la dificultad de realizar un correcto diagnóstico diferencial con otras entidades que cursan de forma similar no ha permitido homogeneizar las muestras clínicas de cara a analizar adecuadamente las diferentes cuestiones latentes en el estudio del TE, como son las características y prevalencia de los diferentes endofenotipos, su penetrancia, las anomalías neuropsicológicas asociadas, las alteraciones estructurales tanto a nivel neuropatológico como neurorradiológico o sus relaciones fisiopatológicas con otros procesos neurodegenerativos.

a. Criterios diagnósticos. ¿Qué es realmente el temblor esencial?

El término "temblor esencial" fue utilizado por primera vez por Burrelli en 1874 para describir a pacientes con un temblor de acción sin otros signos neurológicos y poco tiempo después, los médicos se dieron cuenta que en muchas ocasiones se trataba de un trastorno hereditario (Louis et al., 2008a). Posteriormente, Marsden y colaboradores definieron cuatro tipos de TE y enfatizaron la idea de que el TE no era una entidad única (Marsden et al., 1983). Según el esquema de Marsden, el TE tipo 1 sería un temblor leve en brazos que se produce por un aumento de la oscilación mecánica refleja y correspondería al temblor fisiológico exagerado. El TE tipo 2 es un temblor más severo que el tipo 1 y muchas veces afecta a labios, lengua, voz, cabeza y en ocasiones incluso a las piernas. Estaría producido por un oscilador central, en ocasiones es hereditario y puede llegar a ser discapacitante. El TE tipo 3 es un temblor de mayor severidad y sería la progresión natural del tipo 2. Sin embargo, algunos pacientes con este temblor no tienen historia familiar y en muchos casos se describen en este subgrupo la existencia de signos neurológicos sutiles de parkinsonismo o distonía. El TE tipo 4 se trataría de temblores no específicos probablemente secundarios a otras enfermedades.

En los últimos 20 años, los investigadores han utilizado criterios más restrictivos en un intento de definir una entidad única. En particular han intentado excluir los tipos 1 y 4 de Marsden. En 1998, se establecieron unos criterios diagnósticos de consenso (*Consensus*

Statement of the Movement Disorder Society on Tremor) con la idea de que fueran aceptados de forma generalizada para el diagnóstico clínico y para los estudios epidemiológicos. En estos criterios diagnósticos se establecieron categorías de probabilidad del TE (definido, probable, posible), cada una de ellas con sus criterios e inclusión y exclusión (Deuschl et al., 1998) (Tabla2).

De forma resumida, los tipos 2 y 3 de Marsden cumplirían los criterios TRIG y del Consenso de la MDS para el TE clásico. Los criterios TRIG y MSD difieren en la inclusión de temblor aislado cefálico (MDS) y el requerimiento de una historia de temblor de por lo menos 5 años (TRIG) (Deuschl et al., 1998).

Con la intención de excluir a sujetos con temblor fisiológico exagerado, otros investigadores también utilizaron criterios diagnósticos con requerimientos adicionales en lo que respecta a la amplitud del temblor, asumiendo que algunos pacientes con temblor esencial de baja amplitud serán excluidos del diagnóstico (Louis et al., 1998c). Posteriormente, se combinaron aspectos electrofisiológicos del TE junto con los datos clínicos (Louis & Pullman, 2001). El temblor cefálico aislado fue eliminado de los criterios diagnósticos de TE, debido a que puede ser una manifestación de una distonía cervical en la que el fenómeno distónico no es todavía obvio o de otras enfermedades (Quinn et al., 2011; Deuschl et al., 1998; Bain et al., 2000; Elble & Tremor Research Group 2006b). Un trabajo reciente con estudio de la discriminación somatosensorial temporal sugiere que los temblores aislados cefálicos y de voz deberían ser considerados como entidades clínicas separadas del TE (Conte et al., 2015)

Sin embargo, la noción de que el temblor esencial es un trastorno monosintomático está cambiando y hay una gran cantidad de referencias en la literatura describiendo alteraciones asociadas como son los trastornos de la marcha, distonías, leves alteraciones cerebelosas, cambios en la personalidad, depresión, ansiedad, hipoacusia y déficits cognitivos. También hay evidencias epidemiológicas, patológicas y genéticas de que el TE es fisiopatológicamente heterogéneo y no puede considerarse ya una entidad única por lo que delinear las características fenotípicas centrales de ET es un desafío porque no hay un marcador de

diagnóstico para ET.

Por otra parte, los errores en el diagnóstico son frecuentes incluso en manos de expertos. El diagnóstico del temblor fisiológico exagerado no es fácil y para descartar adecuadamente la existencia de signos atípicos que orienten a otras enfermedades (lo que correspondería al tipo 4 de Marsden), hay que estar atento a lo largo de la evolución. Por ejemplo, independientemente de cómo se defina el TE la aparición frecuente de distonía, parkinsonismo o ataxia sutiles crea una incertidumbre diagnóstica adicional. Además, la importancia clínica del temblor incidente en los miembros superiores depende de la edad de inicio y el desarrollo de un temblor de extremidad superior monosintomático después de los 65 años se asocia con un mayor riesgo de incidencia de EP, demencia incidente y mortalidad por lo que puede ser considerada una entidad distinta. De la misma manera, otros temblores aislados y síndromes de temblor aislados (por ejemplo, temblor cefálico aislado, temblor de escritura, temblores específicos de tareas o el temblor de voz aislado) no deben denominarse TE o variantes del TE. Con el tiempo, algunos pacientes pueden convertirse en un fenotipo alternativo años después del diagnóstico inicial de TE. Para establecer un vínculo entre la presentación clínica y las posibles etiologías, los datos fenotípicos deberían de documentarse de la manera más precisa posible, incluyendo signos de significación incierta (Hopfner et al.,2016)

Tabla 2. Consenso diagnóstico del temblor esencial

(Traducido de Günter Deusch, Peter Bain et al., Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Movement Disorders, 1998 vol 13, supl. 3)

TEMBLOR ESENCIAL DEFINIDO

1. Criterios de inclusión:

- Temblor: temblor postural bilateral con o sin temblor cinético, que afecta a manos y antebrazos y que es visible y persistente. (Puede existir también temblor en otras partes del cuerpo además del de miembros superiores. El temblor bilateral puede ser asimétrico. El paciente refiere el temblor como persistente, aunque la amplitud puede fluctuar. El temblor puede producir o no discapacidad).
- Duración: más de 5 años.

2. Criterios de exclusión:

- Presencia de otros signos neurológicos anormales (excepto la presencia del temblor y el signo de Froment. El examen neurológico completo debe ser normal para la edad del paciente).
- Existencia de causas conocidas que puedan empeorar el temblor fisiológico.
- Exposición reciente o en la actualidad a fármacos o sustancias tremorígenas o un estado de abstinencia de sustancias (muchos fármacos actúan en el SNC y pueden producir temblor como efecto secundario. En la población, el temblor inducido por fármacos es la causa más frecuente de temblor de acción. El paciente debería haber suspendido el fármaco durante un periodo de tiempo que garantice la desaparición del efecto biológico del mismo.)
- Antecedente de traumatismos directos o indirectos en el sistema nervioso en los tres meses que preceden al inicio del temblor (Esto incluye golpes craneales, directos o indirectos, y lesiones periféricas si su distribución es la misma que la del temblor).
- Historia o evidencia clínica de un origen psicógeno del temblor. (La definición de temblor psicógeno está sujeta a debate. Los rasgos clínicos que pueden sugerirlo son las variaciones no fisiológicas en la frecuencia del temblor, características inusuales e incoherentes en la conducta y la remisión espontánea. Los factores psiquiátricos o sociales [somatizaciones múltiples, ganancias secundarias, litigios o compensaciones pendientes] pueden apoyar el diagnóstico de temblor psicógeno)
- Evidencia de un inicio súbito del temblor o de deterioro escalonado del mismo.

TEMBLOR ESENCIAL PROBABLE

1. Criterios de inclusión:

- Los mismos criterios del temblor esencial definido. (El temblor puede estar reducido a otras partes del cuerpo distintos de las manos. Puede incluir cabeza y temblor postural de las piernas. Sin embargo, una postura anormal de la cabeza debe sugerir la presencia de un temblor cefálico distónico)
- Duración superior a tres años.

2. Criterios de exclusión:

- Los mismos criterios del temblor esencial definido.
- Temblor ortostático primario (exclusivamente temblor bilateral sincrónico de miembros inferiores en bipedestación y de alta frecuencia (14-18 Hz))
- Temblor aislado de la voz (por las dificultades clínicas de diferenciar el temblor esencial de la voz de los trastornos del lenguaje en la distonía laríngea y otras distonías del aparato vocal).
- Temblor que aparece exclusivamente en relación con posturas o tareas específicas, incluyendo los temblores ocupacionales y el temblor primario de la escritura.
- Temblor aislado de la lengua o el mentón.

TEMBLOR ESENCIAL POSIBLE.

1. Criterios de inclusión:

• Tipo I:

O Pacientes que cumplen criterios de temblor esencial definido o probable, pero presentan otras enfermedades neurológicas como parkinsonismos, distonías, mioclonías, neuropatías periféricas o síndrome de piernas inquietas.

O Pacientes que cumplen criterios de temblor esencial definido o probable, pero presentan otros signos neurológicos de significado incierto no suficientes para hacer el diagnóstico de enfermedad neurológica. Tales signos pueden incluir signos y síntomas extrapiramidales leves, como hipomimia, disminución del braceo o bradicinesia moderada.

• Tipo II:

Temblores aislados monosintomáticos de relación incierta con el temblor esencial. Se incluyen los temblores que se presentan exclusivamente en determinadas posiciones o tareas, tales como temblores ocupacionales, temblor primario de la escritura, temblor ortostático primario, temblor aislado de la voz, temblor postural aislado de las piernas y temblor postural unilateral de la mano.

2. Criterios de exclusión:

Las exclusiones son las mismas que los ítems 2-4 del temblor esencial definido.

El reconocimiento o no de que la existencia de otros síntomas o signos pueden formar parte del TE no es cuestión baladí, dado que familias con presentaciones de este tipo podrían ser eliminadas, a la hora incluirlas en un estudio genético o en un ensayo terapéutico. Aceptar esta diferenciación de los diferentes fenotipos en pacientes y familias con lo que ahora llamamos TE enfatiza la caracterización completa y rigurosa del temblor además de todos los síntomas y signos presentes, así como de la comorbilidad asociada en cada uno de los pacientes, independientemente si cumple o no los criterios diagnósticos clásicos para el TE. Este abordaje permitirá aumentar la probabilidad de que las alteraciones patológicas, neurorradiológicas, bioquímicas o genéticas sean más homogéneas y de esta manera facilitar nuestra comprensión de los procesos fisiopatológicos subyacentes.

b. Diagnóstico y evaluación del temblor

El primer paso en la evaluación del temblor es la caracterización del mismo en lo que respecta al momento de aparición, evolución, lugar de presentación, amplitud, circunstancias que lo empeoran o atenúan, así como la descripción fenomenológica del mismo (reposo, actitud, cinético, tarea-específico) y su modificación o no con maniobras. Las exploraciones más populares son el mantenimiento de las extremidades superiores en posición horizontal con los codos flexionados en unos 135°, el test dedo-nariz-dedo, y la escritura de una frase y el dibujo de la espiral de Arquímedes; este último ha resultado ser un método de *screening* sensible y específico además de servir como medida de la severidad del temblor (Louis, 2015). El temblor cefálico muy leve es difícil de objetivar hasta que no se observa al paciente realizando movimientos cefálicos verticales u horizontales. El temblor de lengua se detecta mejor con la lengua parcialmente protruida y el temblor facial se observa fácilmente durante la entrevista o cuando se le solicita al paciente que sonría, frunza los labios y cierre los ojos. El temblor de voz se detecta más fácil durante la vocalización mantenida de “ahhh” y “ohhh.” El temblor en las extremidades inferiores puede limitarse a un temblor fino durante el mantenimiento de la postura (sentado con la rodilla extendida) o con las maniobras (talón-

rodilla-espinilla). Es importante la valoración de forma seriada de la amplitud del temblor por medio de las diferentes escalas de valoración cuantitativa, la utilización de videos o las nuevas técnicas digitales, dado que la amplitud del temblor en un mismo paciente puede variar hasta en un 23% en distintos momentos del día (Mostile et al., 2010a; Mostile et al., 2012).

La exploración neurológica completa es necesaria para documentar la existencia de signos concomitantes piramidales, cerebelosos, neuromusculares y sugestivos de parkinsonismo o distonía que pueden hacer sospechar un diagnóstico alternativo al del temblor esencial. Hay que recoger una historia cuidadosa porque muchos fármacos y tóxicos pueden producir temblor (Morgan & Sethi, 2005). El hipertiroidismo se descarta fácilmente mediante una analítica.

Se han desarrollado un gran número de escalas que son útiles para describir la severidad del temblor (Tabla 3).

Tabla 3. Escalas clínicas desarrolladas para la evaluación del temblor

Escalas de Severidad del temblor

- Fahn-Tolosa-Marín Tremor Rating Scale (Fahn et al., 1993)
- Bain and Findley Clinical Tremor Rating Scale (Bain and Findley 1993)
- Bain and Findley Spirography Scale (Bain and Findley 1993)
- Bain and Findley Handwriting Scale (Bain and Findley 1993)
- WHIGET Tremor Rating Scale version 2 (Louis et al., 2001a)
- The Essential Tremor Rating Assessment Scale (TETRAS) (Elble et al., 2012)

Instrumentos de screening

- WHIGET* Tremor Rating Scale version 1 (Louis et al., 1998a)
- WHIGET* Tremor Screening Questionnaire (Louis et al., 1998b)
- Kiel Tremor Screening Instrument (Lorenz et al., 2008)
- Louis Spirography Screening Tool (Louis et al., 2012f)
- Modified finger-nose-finger screening tool (Louis et al., 2005c)

* WHIGET: Washington Heights-Inwood Genetic Study of Essential Tremor

Muchas de ellas han demostrado que son válidas, fiables y sensibles al cambio tal y como se revisó en el análisis realizado en 2013 por la Movement Disorders Society Task Force (Elble et al., 2013b)

Los test electrofisiológicos pueden ser útiles como ayuda para distinguir el temblor esencial del temblor fisiológico, ortostático, el mioclono cortical y el temblor psicógeno (Terada et al., 1997; O'Suilleabhain & Matsumoto, 1998; Koster et al., 1999; Elble 2003; Gironell et al., 2004; Raethjen et al., 2004; Piboolnurak et al., 2005b; Hallett 2010). La anormalidad fundamental observada en el temblor esencial clásico es la sincronización anormal de las unidades motoras a frecuencias de entre 4 a 12 Hz (Deuschl & Elble, 2009). La frecuencia media del temblor está, en general, entre los 4 a los 8 Hz, aunque varía mucho en relación a la edad, severidad del temblor y la parte del cuerpo afectada. La frecuencia tiende a enlentecerse entre 0.07 a 0.12 Hz por año y este cambio en la frecuencia probablemente contribuya al aumento gradual en la amplitud del temblor (Elble 2000b; Hellwig et al., 2009). Los pacientes con temblor esencial avanzado exhiben un retraso en la activación de los músculos antagonistas durante el desarrollo del movimiento (más si éste es rápido), lo que puede contribuir a que se rebase el objetivo de una forma similar a la que ocurre en la dismetría cerebelosa (Koster et al., 2002; Zackowski et al., 2002)

El estudio de la proteína transportadora de dopamina (DAT) estriatal mediante SPECT puede ser útil para distinguir el temblor esencial de la enfermedad de Parkinson en estadios iniciales (Antonini et al., 2008; Ceravolo et al., 2008), aunque tiene sus limitaciones dado que algunos estudios han encontrado una pequeña reducción (<15%) en la captación del DAT en pacientes con temblor esencial, hipocaptación que no es progresiva (Isaias et al., 2008; Gerasimou et al., 2012). El significado de estas pequeñas reducciones en la captación no está claro dado que el DAT-SPECT es generalmente normal en los pacientes con temblor esencial, incluso en aquellos pacientes que presentan una enfermedad avanzada, coexistencia de temblor de reposo y que además no presentan patología de cuerpos de Lewy (Nistico et al., 2011; Gerasimou et al., 2012). El DAT-SPECT no es útil para distinguir el temblor esencial del

temblor distónico (Schneider et al., 2007; Bain 2009).

En los estudios clínicos anteriores a 1993, fue habitual la utilización de acelerómetros uniaxiales con objeto de evaluar el temblor postural, pero los investigadores no fueron conscientes de las limitaciones de estos instrumentos, sobre todo por la relación logarítmica existente entre los resultados de la acelerometría y las puntuaciones de las escalas clínicas (Elble 2005; Elble et al., 2006a). Actualmente hay disponibles una gran cantidad de modelos de acelerómetros triaxiales inalámbricos y giroscopios que permiten la valoración clínica del temblor postural y cinético (Mostile et al., 2010a; Mostile et al., 2012), así como tabletas digitales que son útiles en la cuantificación del temblor durante el dibujo y la escritura (Elble et al., 1990; Elble et al., 1996; Haubenberger et al., 2011). Además, hay nuevas técnicas en desarrollo cuyo objetivo es permitir la distinción de forma objetiva entre el temblor fisiológico y el temblor esencial, principalmente cuando este es leve, como son la medida de los componentes de recuperación del reflejo del parpadeo (Nistico et al., 2012; Nistico et al., 2014; Ayache et al., 2014), medidas cinemáticas (Kurgansky et al., 2014; Ruonala et al., 2014), análisis de los datos de acelerometría (Hossen et al., 2013; Wile et al., 2014), y medidas computerizadas del registro de movimiento ocular (Gitchel et al., 2013). Desafortunadamente, las ventajas que suponen la alta sensibilidad y precisión en el registro lineal de los transductores portátiles de movimiento (acelerómetros, giroscopios, tabletas de digitalización) se mitigan por la gran variabilidad en la amplitud aleatoria del temblor. Por esta razón, el cambio mínimo detectable en la amplitud del temblor es comparable para los transductores y las escalas de calificación clínica mencionadas anteriormente. Sin embargo, los transductores tienen la ventaja de que son capaces de capturar el temblor de forma continua a lo largo del día y no requieren que un clínico esté presente en el momento del registro (Elble et al., 2013b).

c. Diagnóstico diferencial

En los estudios de investigación sobre el temblor esencial se plantea el problema de que ciertos individuos pueden ser particularmente difíciles de diagnosticar debido a que los hallazgos clínicos son dudosos. Estas personas pueden ser difíciles de clasificar, ya sea como casos normales o como casos de TE emergente. Además, el diagnóstico clínico de TE tiene una alta tasa de diagnóstico erróneo, que oscila entre el 37 y el 50% según los estudios (Schrag et al., 2000; Jain et al., 2006; Quinn et al., 2011). Además de los síndromes tremóricos aislados (TE rápidamente progresivo, temblor de acción de inicio tardío, temblores focales como el temblor cefálico, temblor de voz, temblores mandibulares, temblor aislado de extremidad superior) que en el momento actual se consideran entidades distintas al TE clásico (Elble, 2016; Albanese & Del Sorbo, 2016) hay muchas entidades que en algún momento de su evolución pueden ser mal diagnosticadas como temblor esencial y que enumeramos a continuación.

Enfermedad de Parkinson. El temblor característico de la EP es un temblor de reposo de 4-9Hz. Muchos casos de TE pueden ser diagnosticados de EP dado que, particularmente en pacientes ancianos, es frecuente la existencia de cierto grado de rigidez y en ocasiones se aprecia un temblor que es aparentemente de reposo, aunque en realidad se trate de un temblor postural que es causado por una relajación incompleta. (Rajput et al., 1993 ; Rajput et al., 2004 ; Djaldetti et al., 2008 ; Nistico et al., 2011 ; Nistico et al., 2012). Típicamente el temblor esencial afecta a ambas extremidades superiores de forma simétrica pero en más de un 90% de los casos puede haber cierta asimetría al inicio o a lo largo de la evolución (Louis et al., 1998c; Louis et al., 1998d; Phibbs et al., 2009), aunque esta asimetría se observa más frecuentemente en otras enfermedades como la enfermedad de Parkinson, distonía o temblores primarios tarea-específicos (Jain et al., 2006; Chaudhuri et al., 2005). El temblor de reposo monosintomático es casi siempre un signo de una enfermedad de Parkinson u otro tipo de parkinsonismo (Brooks et al., 1992; Ghaemi et al., 2002; Tolosa et al., 2006; Ceravolo et al.,

2008) mientras que el temblor de reposo en el TE nunca aparece en ausencia de un temblor postural y cinético prominente (Whaley et al., 2007), aunque podría ser un signo inicial de una EP coexistente (Djaldetti et al., 2008; Fekete & Jankovic, 2011). El temblor de reposo en la EP se suprime con el inicio del movimiento, al contrario de lo que ocurre en el temblor esencial (Papengut et al., 2013).

Aunque controvertido, hay evidencia de que los pacientes con TE tiene un mayor riesgo que la población control de desarrollar una EP. El diagnóstico en estos casos no resulta fácil porque los pacientes con TE-EP pueden manifestar múltiples tipos de temblor. Para su diagnóstico, en los estudios en los que ha trabajado con estos casos se utilizan unos criterios diagnósticos específicos: (1) que el diagnóstico de TE esté presente al menos cinco años antes del diagnóstico de EP (2) que el TE inicial se caracterice por un temblor cinético de amplitud moderada o alta en ausencia de cualquier signo de EP y (3) que el diagnóstico inicial de TE se haga en ausencia de “signos de alarma” sugestivos de otros diagnósticos alternativos (temblor postural aislado sin existencia de temblor cinético, temblor cinético unilateral) (Louis et al., 2016c)

Distonía. El temblor se ha reconocido como una característica clínica de la distonía. La distonía se define como una contracción muscular sostenida que resulta en movimientos de torsión o posturas anormales. El temblor en la distonía se manifiesta durante el mantenimiento de la postura o con la realización de movimientos voluntarios (temblor de acción) y aunque algunos pacientes distónicos pueden tener temblor en reposo que con frecuencia es unilateral, en pacientes con temblor bilateral, este es a menudo asimétrico. Tiene una frecuencia de 4-7 HZ. Es frecuente la existencia de “gestos antagonistas” así como la presencia de distonía en otras partes del cuerpo. (Schneider et al., 2007; Bain 2009; Quinn et al., 2011). Sin embargo, su diagnóstico no siempre es sencillo. Algunos pacientes presentan temblor focal en ausencia de cualquier signo de distonía, que puede no ser evidente hasta muchos años después. Muchos de los pacientes con temblor de actitud que tienen además temblor de reposo tienen aumentado el componente de recuperación R2 del reflejo del parpadeo que es característico de

la presencia de distonía (Nistico et al., 2012; Nistico et al., 2014). Este hallazgo ha sido interpretado como la evidencia de que el temblor de reposo asociado con temblor de actitud es una forma de temblor distónico, una conclusión apoyada datos clínicos como que la presencia de “distonía sutil” en el 36% de los casos de temblor esencial y la evidencia de que el temblor es un hallazgo fenotípico de la distonía (Defazio, 2015). Los temblores cefálicos aislados deben hacer sospechar la existencia de una distonía cervical (Rivest, 1990). El temblor de la distonía cervical se puede suprimir mediante trucos sensitivos (gesto antagonista), cosa que no ocurre en el temblor esencial (Deuschl et al., 1992; Masuhr et al., 2000). Por el contrario, se agrava cuando el paciente orienta voluntariamente la parte del cuerpo afectada contra la dirección principal del movimiento de la distonía (por ejemplo, un paciente con torticolis hacia el lado derecho puede tener un aumento en el temblor distónico al intentar girar la cabeza hacia la izquierda). Aunque algunos autores sugieren que el temblor de voz aislado podría ser una variante del temblor esencial (Sulica & Louis, 2010), Wolraich et al., estudiaron 29 pacientes con temblor laríngeo y encontraron temblor en brazos sólo en 11 de ellos y una historia familiar de temblor sólo en 5 de ellos. La mitad de ellos tenían distonía laríngea, distonía orofacial o ambas y sólo 2 tenían temblor aislado de voz (Wolraich et al., 2010). Por lo tanto, el temblor aislado de voz no se considera una variante de temblor esencial, sino que es más probablemente una variante de una distonía laríngea (Quinn et al., 2011).

Temblores tarea-específicos. Son temblores posturales o de intención que tienen una frecuencia de 4-8 Hz. Se presentan durante la realización de una tarea concreta (por ejemplo, durante la escritura) y su fisiopatología puede estar relacionada bien con la del temblor esencial como con la de la distonía (Bain et al., 1995). La relación entre el temblor esencial y otros temblores focales y tarea-específicos, como el temblor aislado de barbilla o el de la escritura tampoco está clara (Soland et al., 1996), pero como regla estos temblores no deben de ser considerados como temblores esenciales sino como variantes de distonía focales y/o temblores tarea-específicos. En el caso del temblor específico de la escritura y el temblor aislado de voz no suele haber temblor en otras partes del cuerpo ni otros signos de afectación neurológica

(Ludlow, 1990). El temblor de voz se presenta entre el 15% al 25% de los pacientes con TE y es más frecuente en mujeres (Sulica & Louis, 2010). Hay que diferenciarlo de la disfonía espasmódica, una distonía de la musculatura laríngea en la que el habla es disfónica, dificultosa, tensa, entrecortada y en la que su naturaleza exacta depende de la forma en que están implicados los músculos laríngeos abductores y aductores. En algunos pacientes se presenta una combinación entre temblor y disfonía espasmódica. El temblor mandibular puede ocurrir en el temblor esencial, distonía y la enfermedad de Parkinson. En el caso del temblor esencial tiende a presentarse cuando además existe un temblor cefálico, de voz y temblores severos de extremidades superiores y se acompañan de forma más frecuente con temblor de reposo (Louis et al., 2006).

Temblor ortostático. Es un tipo de temblor poco frecuente que se caracteriza clínicamente por sensación de inestabilidad o caída inminente al adoptar la bipedestación, que desaparece o mejora al caminar y está ausente en sedestación o en decúbito. Sus características electromiográficas, frecuencia de descarga a 13-18 Hz con un alto grado de sincronía entre músculos homónimos, son únicas para este trastorno. Las extremidades superiores sólo se afectan si son usadas como apoyo y mantienen la misma frecuencia de temblor en las piernas (Sander et al., 1998; Koster et al., 1999). Se describen caídas en un 24.1% de los casos. Los trastornos neurológicos coexistentes incluyen temblor de actitud (22.8%), otros tipos de temblor (4.9%), parkinsonismo (8.7%). Se recogen datos de historia familiar de temblor ortostático en un 4.9% de los casos (Hassan et al., 2016).

Temblor fisiológico. Es un temblor de acción, presente en personas sanas y que generalmente no tiene significación clínica. La frecuencia del temblor fisiológico es de 7 a 12 Hz en adultos jóvenes, tiene tendencia a decrecer hasta los 6 a 7 Hz en mayores de 60 años. Es típicamente reversible y ocurre en situaciones de estrés, fatiga, ansiedad, miedo o excitación y se agrava por hipoglicemia, tirotoxicosis, estados hiperadrenérgicos producidos por enfermedades sistémicas, enfermedades psiquiátricas y una gran variedad fármacos y sustancias que son capaces de provocar un aumento en la amplitud del temblor y hacer que

sea difícil de distinguirlo del TE. Desafortunadamente, no existe ningún método totalmente fidedigno para distinguir un temblor esencial leve de un temblor fisiológico exagerado (Elble 1998; Louis et al., 1998c). La supresión del temblor tras ingesta de etanol no es un dato lo suficientemente sensible ni específico como para ser utilizado en el diagnóstico dado que la sensibilidad al alcohol se presenta sólo en el 46% de los casos de TE (Mostile & Jankovic, 2010b; Hopfner et al., 2015).

Temblor inducido por tóxicos y fármacos. Son temblores de frecuencia variable, entre 3-12 Hz. La forma más común de presentación es el aumento del temblor fisiológico secundario al uso de simpaticomiméticos, antidepresivos o abstinencia alcohólica. Las sustancias o fármacos que han sido más frecuentemente descritos como inductores de temblor son los neurolépticos, reserpina, tetrabenacina, metoclopramida, litio, esteroides, calcioantagonistas, agonistas betaadrenérgicos, valpróico, hormonas tiroideas, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptación de serotonina, tocainida, metilxantinas, nicotina, cocaína, alcohol, cafeína, progesterona, antiarrítmicos, calcitonina, citostáticos o inmunosupresores. Los neurolépticos o antagonistas dopaminérgicos producen un temblor de reposo similar al parkinsoniano. El tratamiento prolongado con neurolépticos puede producir también un temblor postural de baja frecuencia (3 a 5 Hz) llamado temblor tardío y la intoxicación con litio produce temblor de características cerebelosas (Puschmann & Wszolek, 2011).

Temblor psicógeno. El temblor de origen psicógeno tiene una incidencia mayor en mujeres que en hombres, pudiendo manifestarse a cualquier edad, aunque no es habitual en niños. Su inicio suele ser brusco, pero no es progresivo y fluctúa en su severidad a lo largo de su evolución. Puede ser postural, cinético o de reposo y su frecuencia y amplitud son muy variables (4-12 Hz). Presentan una frecuencia errática, fluctuaciones en su amplitud y frecuentemente mejoran o reaparecen de forma espontánea. Suelen mejorar, desaparecer o pueden cambiar los parámetros de su frecuencia y amplitud cuando el paciente es distraído con tareas motoras o cognitivas (Deuschl et al., 1998b; McAuley et al., 1998; O'Suilleabhain &

Matsumoto, 1998; Brown & Thompson, 2001; Kumru et al., 2004, 2007; Raethjen et al., 2004; Piboolnurak et al., 2005a; Hallett, 2010). Cuando las oscilaciones son coherentes suelen tener frecuencias bajas (de 6 Hz o más lentas) aunque en algunos pacientes en los que el temblor está provocado por coactivación de los músculos flexores y extensores, presentan una frecuencia más alta (entre 7-10 Hz) (Raethjen et al., 2004). Se acompañan frecuentemente de otras alteraciones o episodios sugestivos de trastornos somatoformes

Temblor cerebeloso. Los temblores cerebelosos son temblores de intención que pueden ser unilaterales o bilaterales dependiendo de la causa. Afectan principalmente a la parte proximal de las extremidades y aumentan en amplitud a medida que la extremidad afectada se acerca al objetivo. La frecuencia y la amplitud son muy variables e irregulares. Se acompaña de dismetrías, ataxia o alteraciones oculomotoras. Las causas más frecuentes son la esclerosis múltiple, ictus o neoplasias que afectan a los núcleos cerebelosos laterales, pedúnculos cerebelosos superiores o sus vías, así como enfermedades degenerativas cerebelosas, la atrofia multisistémica y síndromes paraneoplásicos

Algunas ataxias heredodegenerativas con herencia dominante (SCA2 y SCA8) ocasionalmente se presentan con temblor cefálico y en extremidades superiores (Schols et al., 2004). El problema del diagnóstico diferencial entre temblor esencial y otras enfermedades se ilustra con el hallazgo de que los varones portadores de premutaciones (50 a 200 repeticiones CGG) en el gen FRM1 (*Fragile X Mental Retardation1*) desarrollan frecuentemente un síndrome de temblor y ataxia similar al temblor esencial (Berry-Kravis et al., 2003; Leehey et al., 2003; Tan et al., 2004; Hagerman et al., 2004). Estos portadores varones son normalmente mayores de 50 años y desarrollan, a medida que la enfermedad progresa, una mezcla de temblor de acción, ataxia, parkinsonismo, neuropatía periférica y deterioro cognitivo (Hall et al., 2005). LA RMN cerebral muestra frecuentemente una atrofia cerebral y anomalías en la señal en T2 en los pedúnculos cerebelosos y en el esplenio del cuerpo caloso (Jacquemont et al., 2003) y en los estudios anatomopatológicos se encuentran, de forma generalizada, inclusiones eosinofílicas en astrocitos y neuronas (Greco et al., 2002). La prevalencia de la

premutación en la población es de aproximadamente de 1 entre 800, con una penetrancia estimada del 30% por lo que este síndrome puede afectar a 1 de cada 3000 varones mayores de 50 años (Hall et al., 2005). Por lo tanto, este síndrome hereditario neurodegenerativo, que probablemente está infradiagnosticado, podría constituir un falso diagnóstico de temblor esencial en algún momento de su evolución.

Temblor de Holmes. Es un temblor lento, de 3-6 Hz, que puede ser tanto de reposo como intencional o postural. En el pasado ha recibido múltiples nombres como temblor rúbrico, mesencefálico, talámico o miorritmia (Lee & Marsden, 1994). Se presenta en relación con lesiones estructurales en el mesencéfalo que afectan a las vías nigroestriatales y/o cerebelo-tálamo-corticales y suele acompañarse de signos neurológicos asociados a dichas lesiones. Responden mal al tratamiento farmacológico y hay poca información sobre la utilidad de la talamotomía y de la estimulación cerebral profunda en su manejo (Alusi et al., 2001) aunque la estimulación del VIM ha mostrado ser eficaz en algún caso (Acar et al., 2010).

Temblor palatal. También llamado mioclonía velopalatina, consiste en contracciones rítmicas de músculos agonistas sin contracción de los músculos antagonistas. Tiene una frecuencia más baja, de 1 a 3 Hz, que otros temblores (Deuschl et al., 1994). Se trata de movimientos rítmicos, involuntarios del paladar blando en los que además del movimiento visible, el paciente experimenta un clic audible. En su forma idiopática es característica la pseudohipertrofia de la oliva inferior y en su fisiopatología está implicado el llamado triángulo de Guillain-Mollaret que se extiende desde el núcleo dentado del cerebelo al núcleo rojo contralateral y a la oliva inferior. Cuando es sintomático puede ser secundario a enfermedades como la esclerosis múltiple, patología vascular y enfermedades degenerativas. Otro hecho particular de este síndrome es la persistencia del movimiento durante el sueño e incluso durante el coma y que una vez establecido, es persistente.

Temblor neuropático. Son temblores posturales de 4-12 Hz que se presentan en el contexto de una neuropatía periférica establecida y que se acompañan de debilidad muscular, ausencia de reflejos y trastornos sensitivos distales en las extremidades. No todas las

neuropatías producen temblor. Ha sido descrito de forma más frecuente en las neuropatías desmielinizantes y específicamente en las neuropatías secundarias a disgamaglobulinopatías (especialmente las IgM), en las neuropatías sensitivo-motoras hereditarias tipo 1 (Síndrome de Roussy-Levy), en las polineuropatías inflamatorias agudas en su fase de recuperación y en la polineuropatías inflamatorias crónicas desmielinizantes. En estos casos, el enlentecimiento de la conducción de los nervios produce un aumento en el retraso de las respuestas reflejas de estiramiento que pudiera ser la base fisiopatológica del temblor en estos casos, aunque también se ha invocado la existencia de un mecanismo central. (Said et al., 1982; Elbe 1983; Smith et al., 1984; Smith IS, 1995)

Miorritmias. Son movimientos involuntarios repetitivos, rítmicos, lentos (1-4 Hz) que afectan mayormente a músculos craneales y a brazos y que desde el punto de vista fenomenológico se superponen con el temblor y las mioclonías segmentarias (Baizabal-Carvalho et al., 2015). Su reconocimiento es importante porque en ocasiones se asocian a lesiones potencialmente tratables de troncoencéfalo o talámicas. Un ejemplo es la miorritmia oculomasticatoria asociada a la enfermedad de Whipple. Se han descrito en pacientes con esclerosis múltiple, encefalitis y encefalopatías autoinmunes incluyendo las encefalitis antireceptor NMDA (Baizabal-Carvalho et al., 2013).

Mioclono cortical familiar. Por su relevancia en esta tesis, la entidad conocida como mioclono cortical familiar (*Familial Cortical Myoclonic Tremor with Epilepsy - FCMTE*) merece un comentario más extenso en esta revisión.

El mioclono cortical familiar es una enfermedad de herencia autosómica dominante, caracterizada por temblor, crisis epilépticas, signos electrofisiológicos de hiperexcitabilidad cortical y que generalmente cursa de forma benigna. En 1990, Ikeda et al., propusieron el término de temblor cortical para describir un temblor de inicio en edad adulta, similar al temblor esencial pero asociado a una epilepsia generalizada tónico-clónica (Ikeda et al., 1990). Su origen cortical se sospechó por la existencia de datos de hiperexcitabilidad cortical (aumento del reflejo C en reposo, potenciales evocados somatosensoriales gigantes (SEPs), espigas

premioclónicas corticales). El tratamiento con betabloqueantes no resultaba eficaz, pero fármacos antiepilépticos como el valpróico, clonacepam o la primidona eran capaces de mejorar la amplitud del temblor y de los potenciales gigantes. Desde entonces se han descrito síndromes similares en 51 familias distintas bajo diferentes nombres (BAFME, FAME, FEME, FCTE, ADCME...) hasta que en 2005 Van Rootselaar et al., argumentaron que estos pacientes representaban un espectro de la misma enfermedad con heterogeneidad fenotípica y genética y propusieron el nombre — *“familial cortical myoclonic tremor with epilepsy” (FCMTE)* — y los criterios diagnósticos para este síndrome (Van Rootselaar et al., 2005).

El temblor denominado como temblor cortical, temblor mioclónico o minipolimioclónico, ha sido descrito como sacudidas mioclónicas rítmicas, rápidas y de pequeña amplitud que afectan a dedos y manos y que provocan un movimiento similar a un temblor, de severidad muy variable. Algunos pacientes (hasta el 29%) podrían tener también afectación en piernas y ocasionalmente en cabeza, cara o tronco (Terada et al., 1999; Bourdain et al., 2006). El temblor, que es principalmente postural y de acción, es sensible a diferentes estímulos sensitivos y empeora por las mañanas (Van Rootselaar et al., 2002). Puede empeorar a lo largo de la evolución, como se ha descrito especialmente en familias europeas (Elia et al., 1998; Van Rootselaar et al., 2002), y mejora cuando se trata con fármacos antiepilépticos.

La mayoría de los pacientes (82%) sufren crisis generalizadas tónico-clónicas y una minoría tiene crisis mioclónicas adicionales. Las crisis pueden ser provocadas por la falta de sueño y la fotoestimulación (Bourdain et al., 2006). La frecuencia de las crisis es variable, desde episodios ocasionales hasta una epilepsia de difícil tratamiento, hecho descrito sobre todo en las familias europeas descritas que tienden a requerir de forma más frecuente tratamiento antiepiléptico en régimen de polimedicación (Guerrini et al., 2001).

Otros síntomas adicionales descritos en algunos de los pacientes son: deterioro cognitivo, ceguera nocturna o hipersensibilidad a la luz (Manabeet et al., 2002), episodios periódicos de parálisis (acinesia brusca) con rigidez generalizada sin cambios en el EEG (Morita et al., 2003), migraña (Saka et al., 2000), parkinsonismo o dificultad para la marcha en

tándem (Terada et al., 1997; Nagayama et al., 1998, Van Rootselaar et al., 2002).

El EMG de superficie ayuda a diferenciar el temblor y el mioclono. El patrón habitual consiste en descargas mioclónicas irregulares a una frecuencia de 8-13 Hz de corta duración (50ms) y de baja amplitud que generalmente se manifiestan en los músculos distales de las extremidades superiores y que se provocan con el mantenimiento de la postura o con la acción, aunque, en ocasiones, pueden estar presentes en reposo. Mikami y cols clasificaron el registro en dos tipos: uno con una frecuencia relativamente estable aproximadamente a 10Hz y otro con una frecuencia más variable (Mikami et al., 1999). El trazado EEG del 94% de los afectados muestra complejos punta-onda y la fotoestimulación es positiva en algunos de ellos. También se han registrado cambios en el EEG en el 48% de los familiares que no tienen historia de epilepsia (Saka et al., 2000, Elia et al., 1998, Terada et al., 1997, Striano et al., 2004, Okuma et al., 1997, Van Rootselaar et al., 2002). Estos cambios electroencefalográficos no son específicos para este síndrome. En un 84% de los casos se registra un potencial somatosensorial gigante (P25-N33 de una amplitud mayor de 8.5–15 μ V) y en un 93% de los casos una respuesta refleja-C de larga latencia (40 ms) tras estimulación del nervio mediano en la muñeca (Van Rootselaar et al., 2005). Este es, probablemente, el criterio electrofisiológico más fiable para confirmar el origen cortical del mioclono. Los análisis de coherencia de EEG-EMG son una alternativa útil para confirmar la relación entre el cerebro y músculos durante el movimiento (Grosse et al., 2002). El movimiento fino distal observado en el FCMTE sería el resultado de una oscilación cortical a unos 17 Hz originada en el córtex premotor o córtex motor primario contralateral. En efecto, la presencia de una punta previa al mioclono registrada en el córtex motor contralateral se registra en un 60% de los casos (Van Rootselaar et al., 2006).

El patrón hereditario es compatible con una herencia autosómico dominante sin diferencia entre sexos. Algunos autores japoneses han descrito un fenómeno de anticipación asociada a transmisión materna sugiriendo que estos casos pueden compartir bases moleculares similares a las de las enfermedades secundarias a expansiones de repeticiones

inestables, incluidas aquellas que se producen en regiones no-codificantes (Hitomi et al., 2013). Mikami y cols, mediante un estudio de ligamiento realizado en una extensa familia japonesa, localizaron el gen responsable en la porción distal de 8q23.3-q24.11 (Mikami et al., 1999). Hasta ahora, una familia grande y otras cuatro pequeñas todas ellas de origen japonés, han localizado la mutación en este locus FCMTE1 (Mori et al., 2011). Por lo contrario, no se ha encontrado ligamiento en este locus para una familia de origen española (Labauge et al., 2002) ni en otra holandesa que presentaba en su fenotipo deterioro cognitivo (van Rootselaar et al., 2002). Guerrini y cols encontró ligamiento en 2p11.1-q12.2 (Guerrini et al., 2001) en 8 pacientes de una familia italiana, aunque el fenotipo no era idéntico ya que esta familia presentaba, además de crisis generalizadas, crisis parciales complejas de origen frontotemporal. En 2004, Striano y cols, presentaron a una familia italiana con temblor cortical, mioclonías y crisis generalizadas de curso no progresivo y herencia AD que también mostraba ligamiento en 2p11.1-2q12.2 (Striano et al., 2004). Más tarde, este mismo autor presentó otra familia de cinco generaciones con mioclonía cortical en los miembros afectados y potenciales somatosensoriales gigantes en 3 de sus miembros no sintomáticos, pero con la presencia de mutación en 2p (Striano et al., 2005b). Estas observaciones sugieren que el FCMTE es un trastorno genéticamente heterogéneo con familias japonesas con ligamiento en 8q23.3-8q24.13 y familias europeas en 2p11.1-q12.2. Esta alta frecuencia de familias con las mismas mutaciones en la misma área geográfica de Japón y del Sur de Italia podría ser explicada por un efecto fundador (Uyama et al., 2005; Madia et al., 2008; Mori et al., 2011). Además de esto, se han descrito una inserción/delección en el gen del receptor subtipo B alfa2 adrenérgico (ADRA2B) en dos familias de origen italiano aparentemente no relacionadas (De Fusco et al., 2014). Otros *loci* adicionales se han mapeado en 5p15.31-p15 y en 3q26.32-q28 en familias aisladas de origen francés, thai, y chino (Depienne et al., 2010; Yeetong et al., 2013; Li et al., 2014). Stogmann y cols., describieron en una familia egipcia con consanguinidad y un patrón AR con clínica compatible con FCMTE más síntomas neuropsiquiátricos y cierto retraso en el desarrollo cognitivo. La secuenciación del exoma en esta familia mostró una delección

homocigota (c.503_503delG) en la región codificante de CNTN2 y que segregaba en 5 de los miembros afectados de la familia. La proteína codificada por este gen (contactina 2) es miembro de superfamilia de las inmunoglobulinas. Es una proteína de membrana que funciona como una molécula de adhesión celular y es necesaria para mantener los canales de potasio en la región paraxustanodal. De esta manera, podría jugar un papel en la formación de las conexiones axonales durante el desarrollo del sistema nervioso (Stogmann et al., 2013).

Las bases bioquímicas y fisiopatológicas del FCMTE siguen siendo especulativas. Los hallazgos clínicos y electrofisiológicos sugieren una hiperexcitabilidad cortical, que podría ser consecuencia de una inhibición cortical disminuida por el cerebelo mediada por sus proyecciones cerebelo-tálamo-corticales (Striano et al., 2005a). Los escasos estudios *postmortem* disponibles han evidenciado la existencia de patología cerebelosa (Uyama et al., 2005) y estudios de RMN con VBM muestran también una disminución de la sustancia gris y del volumen total del cerebelo (Buijink et al., 2015).

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. JUSTIFICACION, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

4.1 Justificación

El temblor esencial es el trastorno del movimiento más frecuente y a pesar de su alta prevalencia, desconocemos en gran medida su etiología y su fisiopatología, así como de su relación con otras enfermedades neurodegenerativas. A pesar de su aparente benignidad puede producir una notable incomodidad social y ocupacional y en algunos casos, una importante discapacidad que se ve poco modificada por los tratamientos farmacológicos actualmente disponibles.

De lo expuesto en la introducción se deduce que existen evidencias patológicas, clínicas, epidemiológicas y genéticas de que el temblor esencial es fisiopatológicamente heterogéneo y debe ser contemplado más como un síndrome clínico, que como una única entidad siendo necesaria su redefinición y clasificación con el objeto de avanzar en el conocimiento sobre su etiopatología y tratamiento. Es prioritario el disponer de muestras clínicas homogéneas de cara a analizar las diferentes cuestiones latentes en el estudio del TE: las características fenotípicas y la prevalencia de los diferentes endofenotipos, las anomalías neuropsicológicas asociadas, la penetrancia en los casos familiares, las alteraciones estructurales tanto a nivel neuropatológico como neurorradiológico o sus relaciones fisiopatológicas con otros procesos neurodegenerativos por poner algunos ejemplos.

La dificultad para incluir en un proyecto del tipo *Genome Wide Association* (GWA) una muestra suficiente de pacientes, donde además existe presumiblemente una heterogeneidad genética y clínica, ha hecho que este tipo de aproximación haya dado pocos frutos en el pasado. La ultrasecuenciación (*Whole Exome Sequencing* o WES) permite a partir de una muestra pequeña bien seleccionada encontrar el sustrato molecular en trastornos con gran heterogeneidad genética. Esta aproximación enfatiza la caracterización completa y rigurosa del

temblor además de todos los síntomas, signos y comorbilidad asociada en cada uno de los pacientes independientemente si el paciente cumple o no los criterios diagnósticos clásicos para el TE, lo que permitirá aumentar la probabilidad de encontrar genes responsables del TE y de esta manera facilitar nuestra comprensión de los procesos fisiopatológicos.

Aclarar las bases moleculares y secundariamente las bases fisiopatológicas del temblor, puede proporcionar información muy importante para estudiar otros procesos neurodegenerativos donde el temblor está presente como rasgo clínico. Finalmente, la heterogeneidad del TE es probablemente la causa del escaso éxito de los tratamientos farmacológicos disponibles hasta la fecha y aunque hay que recordar que el desconocimiento etiofisiopatológico de una enfermedad heterogénea no impide la existencia de tratamientos efectivos (p-e. cirugía talámica/subtalámica), el descubrimiento de un gen que confiera riesgo podría revelar la pista de un tratamiento farmacológico para el TE.

Los estudios realizados para esta tesis han pretendido profundizar en estos aspectos a partir de una encuesta clínica de donde se extrajo una muestra clínica de casos familiares seleccionados y en la que se ha aplicado una robusta técnica de ultrasecuenciación masiva, lo que nos ha permitido establecer el sustrato molecular de algunos tipos de temblor esencial.

El trabajo de esta tesis comenzó con el estudio epidemiológico sobre la prevalencia de enfermedades neurológicas que llevamos a cabo en la comarca del Bidasoa finales de la década de los 90 en el que se estudiaron, entre otras enfermedades, la prevalencia del temblor esencial. No ha sido un estudio continuado y el lapso de más de 10 años entre el estudio epidemiológico y los estudios genéticos realizados en las familias, se ha cubierto con el descubrimiento de nuevas familias mientras se ha ido refinando la metodología de estudio genético con la incorporación de técnicas inexistentes en la última década del siglo XX. En ese período, hemos colaborado en el reanálisis de los diferentes estudios epidemiológicos en demencia realizados en España desde la red temática de neuroepidemiología y envejecimiento (RENE envejecimiento) del Instituto de Salud Carlos III. Fruto de ese trabajo que en algunos casos comenzó años antes de formarme como neurólogo a cargo de mi director de tesis,

hemos concluido con éxito la búsqueda de mutaciones en diferentes genes decisivos para el conocimiento de diferentes enfermedades genéticas dominantes y recesivas del sistema nervioso central y periférico (Martí-Massó et al., 2015). En el caso del temblor, la disponibilidad de un amplio registro de casos esporádicos y familiares de TE y la oportunidad de poder realizar el estudio WES de nuestros casos con el grupo de la Dra. Coro Paisán, en el Hospital Mount Sinaí de Nueva York que entonces emprendía un estudio de estas características, nos permitió comenzar con este proyecto parte de cuyos resultados constituyen esta tesis

4.2 Hipótesis

1. El descubrimiento previo en nuestra población de mutaciones privadas y recurrentes en genes decisivos para el conocimiento de diferentes enfermedades genéticas dominantes y recesivas del sistema nervioso central y periférico (LRRK2, PNRP, GDAP1, CANP3, PGRN, etc.) (Martí- Massó et al., 2015) así como la posibilidad de utilizar la combinación de nuevas y robustas técnicas de ligamiento mediante arrays de SNPs de millones de variantes así como de técnicas de ultrasecuenciación, podría, en una muestra clínica de base poblacional como la coleccionada durante años por la Unidad de Movimientos Anormales y la Unidad de Neurogenética del Servicio de Neurología del Hospital Donostia, contribuir a definir las características de los diferentes endofenotipos asociados a cada variante genética encontrada en el WES.

2. El conocimiento de las características clínico-morfológicas de los diferentes tipos de TE, nos permitiría a su vez orientar una clasificación nosológica del TE a la vez que avanzar en el conocimiento de la etiopatogenia del temblor.

4.3 Objetivos

1. Conocer la prevalencia y las características demográficas del temblor esencial en nuestra población.

2. Identificar a partir de esa encuesta epidemiológica y otras fuentes, estirpes familiares singulares con fenotipos simples o complejos, susceptibles de ser analizadas mediante técnicas moleculares avanzadas (WES).

3. Caracterizar la expresión fenotípica del temblor en cada una de las familias e identificar si existen rasgos clínicos comunes para cada una de las mutaciones/*loci* genéticos identificados (penetrancia, edad de inicio de los síntomas, características clínicas y neurofisiológicas del temblor, presencia de alteraciones motoras/no motoras asociadas, rasgos neurorradiológicos y rasgos neuropsicológicos), así como los límites fenotípicos de cada entidad molecular descubierta.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. METODOLOGIA

A continuación, se especifica la metodología utilizada para la realización de cada uno de los trabajos.

5.1. Trabajo 1. Prevalencia del Temblor Esencial: estudio puerta a puerta en la Comarca del Bidasoa, España.

El Estudio Bidasoa fue un estudio epidemiológico de base comunitaria realizado en sujetos mayores de 65 años de edad con residencia en dos municipios de la comarca del Bidasoa, Irún y Hondarribia, situadas en el norte de la provincia de Guipúzcoa (España). De acuerdo con el censo de 1996, había 13.434 personas mayores de 65 años y 2000 de ellas fueron seleccionadas para el estudio mediante un muestreo aleatorio estratificado por grupos de 2 años de edad y sexo. Este número nos permitió estimar una prevalencia de enfermedades del 5% o menor, con una precisión de 1% y un 95% de confianza. En el estudio piloto realizado previamente hubo aproximadamente un 10% de "no respuestas". La primera fase del estudio fue llevada a cabo por entrevistadores entrenados, mientras que la segunda fase fue completada por neurólogos del Hospital Universitario Donostia (San Sebastián, España) y el Hospital Bidasoa (Hondarribia, España).

El objetivo del Estudio Bidasoa era el de determinar la prevalencia de demencia, epilepsia, ictus, temblor y la enfermedad de Parkinson y otras formas de parkinsonismo.

Se realizó una validación de los instrumentos de *screening* utilizados por Meneghini en el estudio epidemiológico de Sicilia (SNES) (Meneghini et al., 1992). La sensibilidad del SNES fue del 75% para el temblor y del 100% para el resto de las patologías. La especificidad fue de 34%.

Procedimientos para la detección de casos

El estudio utilizó un diseño puerta a puerta en dos fases. En la fase 1, los participantes fueron evaluados, puerta a puerta, por entrevistadores entrenados utilizando la versión española del cuestionario SNES. El instrumento de *screening* para el temblor preguntaba por la existencia de movimientos involuntarios o sacudidas en extremidades, cabeza, cara o lengua, además de una segunda pregunta sobre la existencia de temblor de reposo en cabeza o extremidades y/o temblor postural o de acción. La evaluación se realizó mediante la examinación del sujeto mientras mantenía ambos brazos extendidos durante 20 segundos. También se preguntó acerca de diagnósticos previos de temblor, enfermedad de Parkinson, el uso de los betabloqueantes, antiepilépticos, agonistas dopaminérgicos y benzodiacepinas. Aquellos que resultaron positivos para el *screening* (un ítem positivo) fueron validados en la fase 2, que consistió en una evaluación completa realizada por un neurólogo.

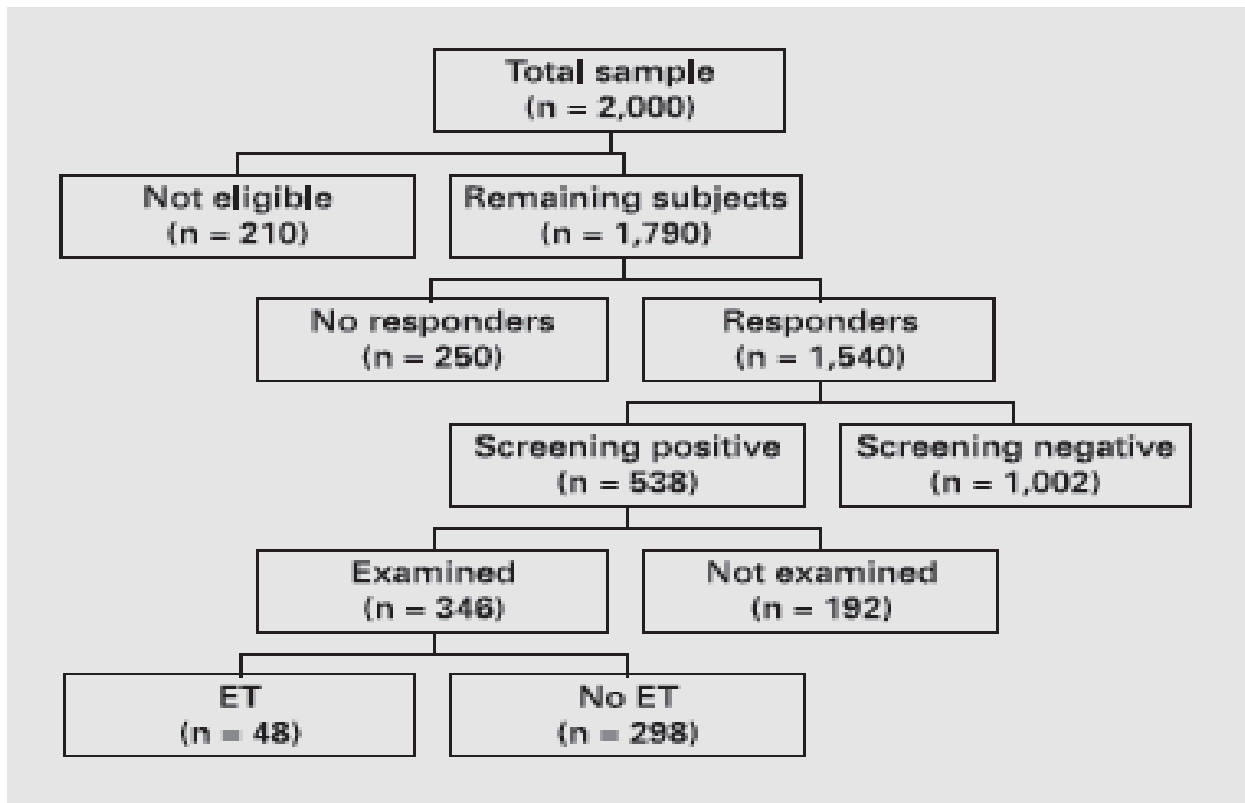
Se definió el temblor esencial como un temblor postural o cinético de cabeza o extremidades que estuviera presente sin que existiera una causa conocida utilizando los criterios diagnósticos de Louis y colaboradores (Louis et al., 1998). El temblor debía de tener una evolución progresiva y una duración de por lo menos 1 año, o que existiera una historia familiar de temblor en el caso de una duración inferior al año (por lo menos un familiar de primer grado afecto) (Salemi et al., 1994)

Análisis de datos

Las estimaciones de la prevalencia se presentan por grupos de edad de 3 años. Para poder obtener estimaciones de prevalencia estables, todos los grupos tenían que tener más de 10 sujetos en el denominador. La prevalencia se calculó utilizando el método de Ogura (Ogura et al., 1995). Este método asume que las personas que dan positivo en la fase de *screening* y no pasan la segunda fase tienen una prevalencia similar a los que si lo hacen. Los intervalos de confianza del 95% se calcularon siguiendo el método binomial. Las cifras de prevalencia se presentan por sexo y grupos de edad (65-74, 75-84, >85). Se realizó un análisis de regresión logística para determinar la existencia de una posible asociación entre la edad y sexo. El

análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS para Windows v. 6 y Epi-Info, v. 6.

Figura 1: Población de estudio en general y sus subgrupos (Bergareche et al., 2001)



5.2. Trabajo 2. El gen ACMSD, que participa en el metabolismo del triptófano, se encuentra mutado en una familia con mioclonías corticales, epilepsia y parkinsonismo.

Sujetos

Primeramente, se construyó un árbol genealógico detallado mediante la recopilación de las historias clínicas de todos los miembros de la familia que presentaba un fenotipo de temblor complejo transmitido con herencia dominante, y que incluye a aquellos posiblemente afectados, así como a los no afectados clínicamente y cónyuges (figura 2-A). Se identificaron 7 individuos afectados en tres generaciones diferentes y se pudo realizar una evaluación clínica completa de cuatro ellos. Todos ellos firmaron un consentimiento informado previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Donostia tras lo que se obtuvieron muestras de DNA mediante extracción de sangre total utilizando procedimientos estándar. También se dispusieron para el análisis de 94 muestras de DNA (49 mujeres y 45 hombres) pertenecientes a individuos sin enfermedades neurológicas y sin antecedentes familiares de trastornos del movimiento, procedentes del Banco de DNA de la Unidad de Neurociencias del Instituto Biodonostia. La edad en el momento de la recogida de las muestras de los individuos de control varió entre los 60 a los 93 años, con un promedio de 69,1 años. También se dispuso de muestras de 58 casos de TE esporádico y 11 con TE familiar y otros 54 casos de EP de inicio tardío. Todos los casos examinados eran de la misma región geográfica del norte de España.

Estudios neuropsicológicos y electrofisiológicos

Se utilizó el test MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*), que evalúa diferentes dominios cognitivos (<http://www.mocatest.org/>), para determinar la existencia de disfunción cognitiva. Los registros electroencefalográficos (EEG) se obtuvieron tras la colocación de los

electrodos según el sistema de internacional de colocación de electrodos 10-20. Se utilizaron técnicas estándar para los estudios de conducción nerviosa registrándose respuestas motoras peroneales y tibiales y sensitivas surales. Para el estudio de los potenciales evocados somatosensoriales, se estimuló el nervio mediano en la muñeca y se registraron los potenciales evocados en el cuero cabelludo contralateral (C3' y C4': 2 cm por detrás C3 y C4 en el sistema internacional 10-20). La estimulación se realizó a 3 Hz con una duración del estímulo de 0,2 mseg. La promediación digital se realizó con 200 registros; los filtros se fijaron en un corte alto de 500 Hz y otro bajo de 10 Hz. Se analizaron los picos de latencias N20 y P25 y las amplitudes interpicos N20-P25. El estudio se llevó a cabo tres veces en cada caso para asegurar su reproducibilidad. Los electromiogramas de superficie (EMG) se registraron en los músculos extensores y flexores de la muñeca utilizando electrodos de superficie colocados sobre los vientres musculares a 3 cm de distancia. Los filtros se fijaron con un paso de banda de 10 Hz-1 kHz. Se colocó un acelerómetro triaxial sobre el primer músculo interóseo dorsal de la mano. Los reflejos-C se registraron desde el músculo abductor corto del pulgar después de realizar un estímulo supramáximo sobre el nervio mediano en la muñeca.

WES

El estudio WES fue realizado en tres de los casos afectos (I-5, II-3, y III-1; Figura 2A). Se utilizó el kit *SureSelect Human All exon 50Mb exon-capture* para el enriquecimiento de la librería (*Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA*). Las secciones del exoma capturadas fueron secuenciadas en un *HiSeq2000* de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante lecturas de 100-bp pareadas por su región final (*Illumina Inc, San Diego, CA, USA*) y para capturar la máxima variación genética posible, cada muestra se analizó en una única línea de cada dispositivo de análisis. Tras la secuenciación, el procesamiento de datos del WES fue realizado mediante cálculo computacional, analizándose según el protocolo utilizado por el proyecto 1000 genomas, como se ha descrito previamente (Karkheiran et al., 2013). Seguidamente, cualquier mutación potencial observada como una variación común según las bases *dbSNP137* o *1000 Genomes Project Phase 1*, fue retirada para un análisis

posterior. También fueron excluidas las variantes genéticas de las regiones intergénicas, intrónicas y exónicas no codificantes, con la excepción de aquellas variantes mapeadas cerca de los lugares de *splicing*, ya que es poco probable que fueran causales. También se extrajeron las variantes genéticas presentes en otras bases de datos públicas, tales como la Exome Variant Server of the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (Exome Variant Server, 2013) y los exomas generados en nuestro laboratorio. Para ayudar en la identificación de genes causales, se predijo la patogenicidad de cada mutación que segregaba con la enfermedad mediante dos métodos de cálculo previamente evaluados como los más eficientes [MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>), SNPs & Go (<Http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>)] (Thusberg et al., 2011). También se utilizó la *HomoloGene database* del sitio web de la NCBI para examinar la conservación de la segregación de las mutaciones y enfermedades en diferentes especies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).

Análisis de los genes detectados

Se diseñaron *primers* genómicos para las amplificaciones de PCR usando un sitio web para *primers* (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>). Se utilizaron estos *primers* para amplificar todos los exones codificantes y *splices* de los genes ACMSD y MYBBP1A (material suplementario en el artículo original). Posteriormente se realizaron y analizaron las amplificaciones de PCR y las reacciones de secuenciación tal y como se han descrito previamente (Karkheiran et al., 2013).

5.3 Trabajo 3. La mutación SORT1 p. G171A descrita en una familia con temblor esencial produce deficiencia de sortilina y altos niveles de p75NTR

Sujetos

Hemos examinado clínicamente y mediante un análisis *WES* a una familia española con TE que consta de padre afectado, esposa sana, una hermana del padre no afectada y tres hijos, uno afecto y dos no afectados (Figura 3 (a)). Esta familia fue reclutada a partir de un estudio descriptivo de TE familiar y esporádico llevado a cabo en la Unidad de Movimientos Anormales del Hospital Donostia (San Sebastián, España).

Se dispusieron para el estudio muestras de DNA de todos los miembros de la familia, así como muestras adicionales de 28 casos de TE familiar y 62 casos esporádicos. También dispusimos de 188 muestras de controles de origen español y sin historia de sufrir trastornos del movimiento. La edad a la recogida de muestras de la cohorte de control varió de los 60 a los 93 años con una edad media de 69,1 años. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Donostia.

Estudio WES

Se realizó un estudio *WES* en cuatro muestras: dos de sujetos afectados (casos 1 y 3) y dos no afectados (casos 2 y 4) (Figura 3 (a)). Se utilizó el kit SureSelect Human All exon 50Mb exon-capture para el enriquecimiento de la librería (*Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA*). Las secciones del exoma capturadas fueron secuenciadas en un HiSeq2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante lecturas de 100-bp pareadas por su región final (*Illumina Inc, San Diego, CA, USA*) y para poder capturar la máxima variación genética posible, cada muestra se analizó en una única línea de cada dispositivo de análisis. Tras la

secuenciación, el procesamiento de datos del WES se realizó mediante cálculo computacional y finalmente se analizaron según el protocolo utilizado por el proyecto 1000 genomas (DePristo et al., 2011), y como se ha descrito previamente (Martí-Massó et al., 2013). El análisis estadístico de cada exoma se realizó en PICARD (<http://picard.sourceforge.net/>).

Filtrado de variaciones genéticas comunes

Se retiraron de los análisis posteriores todas aquellas mutaciones potenciales observadas como variaciones comunes (frecuencia > 5%) en las compilaciones más recientes como dbSNP137, Proyecto 1000 Genomas Fase 1, otras bases de datos públicas tales como el *Exome Variant Server of the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>; Exome Variant Server, 2015), o en los exomas generados en nuestro laboratorio (Martí-Massó et al., 2013). Solamente se consideraron causales aquellas variantes genéticas mapeadas en regiones codificantes o de *splicing*.

Predicción de la patogenicidad de la mutación

La patogenicidad de cada una de las mutaciones que segregaban con la enfermedad fue predicha mediante de cuatro métodos de cálculo: *MutPred* (<http://mutpred.mutdb.org/>), *SNPs&Go* (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), y Mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>), y se utilizó la base de datos NCBI HomoloGene para examinar la conservación de los nuevos SNVS identificados en diferentes especies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>). Se utilizaron las bases *Human Gene Mutation Database* (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php>) y la NCBI ClinVar database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) para determinar si las nuevas variaciones de nucleótidos únicos (SNVs) estaban asociadas o no con el fenotipo relacionado con la enfermedad.

Análisis de detección de genes

Se diseñaron *primers* genómicos para la amplificación por PCR de la región codificante

completa de las regiones fronteras exón-intrón SORT1, del exón 5 de LAPTM5, y exón 13 de GRIN2D utilizando un sitio web público para el diseño de *primers* (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>; primer sequences available upon request).

Se secuenció todo el producto de PCR purificado, tanto hacia delante como en sentido inverso, mediante secuenciación Sanger utilizando el sistema Applied Biosystems BigDye terminator v3.1 según las instrucciones del fabricante y se analizaron tal y como está previamente descrito (Martí-Massó et al., 2013).

Análisis de mutagenicidad y cultivos celulares.

Se cultivaron células de riñón embrionario humano HEK293 en medio Dulbecco modificado, suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina / estreptomicina. Se introdujo la mutación p.Gly171Ala del gen SORT1 (p.G171A) en el plásmido humano natural pCMV6-XL5-SORT1 (Origene, Rockville, MD) mediante mutagénesis dirigida al sitio (QuikChange, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Todos los constructos generados fueron verificados mediante secuenciación Sanger utilizándose la secuencia humana GRCh37 como referencia. Las células HEK293 se cultivaron en placas de cultivo de 96 y de 12 pocillos. Después de alcanzar la confluencia (80%), las células fueron transfectadas utilizando FuGene 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, WI) con 0,1 mg de pCMV6-XL5-SORT1 de tipo salvaje o con plásmidos humanos mutantes. Después de 24 horas, los medios de cultivo fueron reemplazados y las células fueron tratadas de forma independiente con 10 ng/ml o 30 ng/ml de dos factores pro-neurotróficos diferentes: el precursor del factor de crecimiento de nervio (proNGF) y el precursor del factor neurotrófico derivado del cerebro (proBDNF), o con una combinación de ambos (Novoprotein, Summit, Nueva Jersey). Las células fueron entonces incubadas a 37°C durante 72 horas excepto para el análisis de apoptosis para el que se utilizó una incubación de 16 horas.

Análisis de expresión génica

La extracción del RNA de las células HEK293 se realizó utilizando el kit *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) según las instrucciones del fabricante. El RNA extraído fue transcrito en el DNAc mediante la transcriptasa inversa SuperScript II (Life Technologies, Grand Island, NY). La expresión génica se llevó a cabo mediante qPCR utilizando Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA), SYBRGreen PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), y las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

SORT1-F 0-GGGGACACATGGAGCA TGG-30 y SORT1-R 50-GGAATAGACAATGCCTCGATCAT-30 para la expresión de SORT1, B2MF1-F 50-GGCCGAGATGTCTCGCTCCG-30 y B2MR1 50-TTGGAGTACGCTGGATAGCCTCC-30 para B2M, y p75-F 50-CCTACGGCTACTACCAGGATG-30 y p75-R 50-CACACGGTGTCTGCTTGT-30 para p75NTR. Las muestras se corrieron en triplicados, fueron analizadas mediante el método de la curva estándar y normalizadas para el control génico endógeno B2M utilizando el método 2 CT (Livak and Schmittgen, 2001).

Análisis de Inmunotransferencia

Se prepararon muestras de lisados de células en una preparación de inmunoprecipitación radiactiva y se trataron con un cóctel de inhibidores de proteasas. Se añadió la misma cantidad de proteínas a la preparación de Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA), se calentaron durante 5 min a 95° C y se cargaron en 15 pocillos de gel Bis-Tris con concentraciones del 4% al 12% (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA), se bloquearon con 5% de leche en polvo sin grasa en Phosphate Buffered Saline con Tween-20 (PBST) y se incubaron con el anticuerpo primario anti-SORT1 (1 mg / ml; (Abcam, Cambridge, MA; ab16640) y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa *horseradish* (1: 5000; Abcam; ab6721). Se utilizó como control el anticuerpo anti-GAPDH (1: 5000, Trevigen, Gaithersburg, MD). La expresión de la proteína se detectó mediante el uso de Iluminada Forte (Millipore, Billerica, MA).

Las imágenes de gel se obtuvieron mediante un analizador de imágenes G: BOX Chemi (Syngene, Frederick, MD) y los análisis densitométricos se llevaron a cabo mediante el 96 software ImageJ (Imagej.nih.gov).

Inmunoensayo con ELISA

Se detectó la progranulina humana (hPGRN) en medio condicionado de células de tipo salvaje y en células mutantes HEK-293 utilizando el kit DuoSet ELISA Development System kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) siguiendo el protocolo del fabricante. La hPGRN de las cinco muestras humanas (casos 2-6; Figura3 (a)) se midió usando el kit hPGRN ELISA de Adipogen (San Diego, CA). Los valores de absorbancia se midieron usando un lector de placas multimodal M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a longitudes de onda de 450 nm y 560 nm.

Estudio de apoptosis por citometría de flujo

El estudio de apoptosis se realizó por citometría de flujo mediante el análisis cuantitativo de la muerte celular apoptótica utilizando la *Alexa Fluor 488 Annexina V / Dead Cell Apoptosis Kit* de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se trataron las células HEK293 con 30 ng/ml de proneurotrofinas (proNTs) durante 16 horas; a continuación, se recogieron las células, se tiñeron con Alexa Fluor 488-annexina V y PI en un buffer de unión de anexina y se analizaron por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo BD LSR II y el software BD *FACSDiva* (BD Bioscience, San Jose, CA). Se consideró que sólo las células teñidas con anexina V presentaban apoptosis temprana, mientras que las células teñidas con anexina V y PI se encontrarían en situación de apoptosis tardía o en fase necrótica. Las células HEK293 tratadas con 2 mM de peróxido de hidrógeno se utilizaron como control positivo para la apoptosis. El análisis de datos se realizó mediante el software FlowJo versión de 9.3.2 (TreeStar, Ashland, Oregón).

(

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism, version 6.00 estándar (GraphPad, La Jolla, CA). Los datos en las gráficas se presentan como medias +/- error. Las diferencias estadísticas entre los tipos salvaje y mutante fueron calculadas utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La significación estadística para la expresión de RMNm de SORT1 utilizando diferentes concentraciones de proN, ha sido determinada utilizando un modelo de regresión lineal. Valores de $p \leq 0.001$ han sido considerados altamente significativos.

5.4 Trabajo 4. La mutación de SCN4A contribuye a la patogénesis de 98 una forma de temblor esencial autosómico dominante y puede aumentar la susceptibilidad a la epilepsia

Sujetos

Primeramente, se construyó un árbol genealógico detallado mediante la recopilación de las historias clínicas de todos los sujetos posiblemente afectados, así como del resto de familiares no afectados. Todos ellos firmaron un consentimiento informado previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Donostia. Se obtuvieron muestras de DNA de todos los miembros mediante extracción de sangre total utilizando procedimientos estándar. También se dispuso para el análisis de 94 muestras de ADN (49 mujeres y 45 hombres) pertenecientes a individuos sin enfermedades neurológicas y sin antecedentes familiares de trastornos del movimiento. La edad de los individuos de control en el momento de la recogida de muestras varió entre los 60 a los 93 años, con un promedio de 69,1 años. También se examinaron para la mutación causal de la enfermedad identificada en este estudio, las muestras de 76 casos de TE esporádico y 25 con TE familiar y, de forma adicional, también se examinó la región codificante completa del gen SCN4A en 22 casos de ET familiar.

Evaluación clínica

Todos los participantes en el estudio completaron un cuestionario semiestructurado y una valoración neurológica y neuropsicológica realizados por tres especialistas en trastornos del Movimiento de la Unidad de Movimientos Anormales del Hospital Universitario Donostia. Cada uno de los pacientes diagnosticados de TE fue primeramente valorado por uno de los neurólogos y el diagnóstico fue posteriormente confirmado por consenso por el resto del equipo tras la revisión de los datos clínicos, electrofisiológicos y tras una segunda evaluación utilizando los criterios diagnósticos de consenso.

En la evaluación se utilizó el siguiente protocolo: (1) variables demográficas; (2) historia y antecedentes patológicos familiares y personales (*Cumulative Illness Rating Scale score*

(rango: 0–42), número total de medicaciones prescritas); (3) evaluación neurológica: cuestionario de quejas motoras subjetivas, la escala de valoración de estabilidad ABC (Activities-Specific Balance Confidence), exploración motora incluyendo la escala UPDRS (parte III) y una exploración general con el objeto de detectar la existencia de distonía, mioclonías, ataxia, polineuropatías así como una exploración específica del temblor que incluyó un test para el temblor postural y cinco test para el temblor cinético; (4) el uso de medicación (si versus no); (5) variables adicionales de interés (e.g. edad de inicio de los síntomas) (6) valoración de la disfunción autonómica mediante el test SCOPA-AUT (Visser et al., 2004) y (7) el test Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) (Buysse et al., 1989). En un esfuerzo de minimizar los errores diagnósticos, se han seguido los criterios diagnósticos de consenso de la *Movement Disorder Society on Tremor* (Deusch et al., 1998) y del *Washington Heights–Inwood Genetic Study of Essential Tremor* (Louis et al., 1997).

Examinación neuropsicológica y electrofisiológica

Además de la exploración clínica descrita, la valoración del temblor fue completada mediante el dibujo de la espiral de Arquímedes y la escala de Fahn-Tolosa-Marín TRS (Elble et al., 1990; Fahn et al, 1993). Se utilizó el test MoCA (Montreal Cognitive Assessment), que evalúa diferentes dominios cognitivos (<http://www.mocatest.org/>), para la determinación de la disfunción cognitiva (valor normal >25), y los criterios del DSM-IV para el diagnóstico de depresión y trastornos de ansiedad (American Psychiatric Association, 1994). Los registros electroencefalográficos se obtuvieron tras la colocación de los electrodos según el sistema de colocación internacional de electrodos 10-20. Se utilizaron las técnicas estándar para los estudios de conducción nerviosa registrándose respuestas motoras peroneales y tibiales y sensitivas surales. Para el estudio de los potenciales evocados somatosensoriales, se estimuló el nervio mediano en la muñeca y se registraron los potenciales evocados en el cuero cabelludo contralateral (C3' y C4': 2 cm por detrás C3 y C4 en el sistema internacional 10-20). La estimulación se realizó a 3 Hz con una duración del estímulo de 0,2 mseg. La promediación digital se realizó con 200 registros; los filtros se fijaron en un corte alto de 500 Hz y otro bajo de

10 Hz. Se analizaron los picos de latencias N20 y P25 y las amplitudes interpicos N20-P25. El estudio se llevó a cabo tres veces en cada caso para asegurar la reproducibilidad. Los electromiogramas de superficie se registraron en los músculos extensores y flexores de la muñeca utilizando electrodos de superficie colocados sobre los vientres musculares a 3 cm de distancia. Los filtros se fijaron con un paso de banda de 10 Hz-1 kHz. Se colocó un acelerómetro triaxial sobre el primer músculo interóseo dorsal de la mano. Los reflejos-C se registraron desde el músculo abductor corto del pulgar después de realizar un estímulo supramáximo sobre el nervio mediano en la muñeca.

Análisis WES

El WES fue realizado en cuatro casos; dos de los casos con TE (Casos 2, 8), un caso con epilepsia mioclónica juvenil (Caso 9) y un no afecto (Caso 4) (Fig. 4A). Se utilizó el kit *SureSelect Human All exon 50Mb exon-capture* para el enriquecimiento de la librería (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Las secciones del exoma capturadas fueron secuenciadas en un HiSeq2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante lecturas de 100-bp pareadas por su región final (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) y para poder capturar la máxima variación genética posible, cada muestra se analizó en una única línea de cada dispositivo de análisis. Tras la secuenciación, el procesamiento de datos del WES se realizó mediante cálculo computacional y finalmente se analizaron según el protocolo utilizado por el proyecto 1000 genomas, como se ha descrito previamente (De Pristo et al., 2011).

Brevemente, las secuencias leídas en bruto fueron alineadas con la secuencia del genoma humano de referencia (NCBI GRCh37.p13) mediante una herramienta rápida y ligera; *Burrows–Wheeler Alignment Tool (BWA)* (Li et al., 2009), seguido de una recalibración y realineamiento local mediante el *Genome Analysis Toolkit (GATK v1.5-16-g58245bf)*; para detectar sustituciones únicas de nucleótidos (SNP/SNV) y para las inserciones/deleciones cortas (INDELS) se utilizó el *GATK Unified Genotyper*. Los resultados fueron filtrados en base a

la calidad de mapeo (q30 o mayores) y a la profundidad de la cobertura (d10 o mayor), y el resultante fue finalmente anotado mediante un exhaustivo método de anotación (AnnTools) (Makarov et al., 2011). El análisis estadístico de cada exoma fue realizado en PICARD (<http://picard.sourceforge.net/>).

Posteriormente, cualquier potencial mutación observada como una variación común (frecuencia >3%) según las últimas bases, como la *dbSNP137*, *1000 Genomes Project Phase 1*, *the Exome Variant Server of the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (Exome Variant Server, 2015) o los exomas generados en nuestro laboratorio (Krebs et al., 2013; Martí-Massó et al., 2013) fue retirada para un análisis posterior. También fueron retiradas las variantes genéticas de las regiones intergénica, intrónica, y exónicas no codificantes, con la excepción de aquellas variantes mapeadas cerca de los lugares de los sitios de *splicing*, ya que es poco probable que fueran causales. Para realizar análisis *in silico* de la nueva mutación SCN4A identificada en este estudio, se utilizó el software *Alamut Visual 2.4.2* (<http://www.interactivebiosoftware.com/alamut-visual/>). También se emplearon otros métodos computacionales para la predicción de patogenicidad que no estaban incluidos en el software Alamut como el *MutPred* (<http://mutpred.mutdb.org/>) y el *SNPs&Go* (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>). Para determinar si la mutación SCN4A-p.Gly1537Ser estaba asociada o no con el fenotipo relacionado con la enfermedad, se utilizó la base profesional *Human Gene Mutation Database* (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php>) y la *NCBI ClinVar database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Screening de genes candidatos

Se diseñaron *primers* para las amplificaciones por PCR de los genes RIMS1 exón 21, KMT2C exón 30, UNC13B exón 8, AGAP5 exón 8, NFATC4 exón 2, ANKFN1 exón 16 y todos los exones de SCN4A utilizando un sitio web público para el diseño de *primers* (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>; primer sequences available upon request).

Se secuenciaron todos los productos de PCR purificados, tanto hacia delante como en sentido inverso, mediante secuenciación *Sanger* utilizando el sistema *Applied Biosystems BigDye terminator v3.1* según las instrucciones del fabricante. Las reacciones resultantes fueron resueltas en un analizador genético ABI3730 (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) y fueron analizadas utilizando el software *Sequencher 5.2* (*Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI*).

Ensayos de expresión génica

Se realizaron estudios de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR; Reverse transcription polymerase chain reaction) de cerebro (cerebro de ratón de 2 meses de edad, *Zyagen*) y de RNA de músculo esquelético de ratón (*BioChain*) con el kit RT-PCR de *Qiagen* y los *primers* que se han descrito en material suplementario del artículo (tabla S1). Los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa al 1.5%, tiñeron con *Red Safe* (*iNtRON Biotechnology*) y secuenciaron como se ha descrito previamente. El RNA total del córtex cerebral humano se adquirió a *Clontech* (*Clontech, Mountain View, CA*) y se transcribió al DNAC utilizando el kit de transcripción inversa *Omniscript* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Qiagen, Hilde, Germany*). Para cuantificar los niveles de expresión de los genes SCN1A, SCN2A y SCN4A se utilizó una cuantificación absoluta utilizando una curva estándar generada con siete diluciones en serie de DNAC (0,4 a 425 ng). Los genes SCN1A y SCN2a fueron utilizados como genes de control. Todos los ensayos de qPCR se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real, *Eco Real-Time PCR* (*Illumina, San Diego, CA*) utilizando una mezcla maestra de PCR, SYBR green (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) y las secuencias de oligonucleótidos se describen en el artículo (material suplementario, Tabla S1). Las

muestras se analizaron por cuadruplicado, y en cada ejecución se incluyeron controles. Los datos se analizaron de forma automática con *Eco software*.

Análisis funcionales

La mutagénesis dirigida al sitio se realizó por PCR de un plásmido pCR-CMV-EGFP que contenía SCN4A. Se transfectaron células TsA201 con el DNAC de tipo salvaje o mutante utilizando el kit de jetPEI. Los registros de células enteras estándar se realizaron con un protocolo -p / 4 para sustraer la corriente de fuga. Los datos adquiridos con pCLAMP 10 (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA*) se filtraron a 5 kHz y se analizaron mediante una combinación de pCLAMP y ORIGIN (MicroCal) (*Malvern Instruments, Westborough, MA*). Los electrodos utilizados para los experimentos de activación, inactivación y recuperación contenían la solución patrón (en mM): CsF 105, NaCl 35, EGTA 10 y HEPES 10. El baño contenía una solución estándar compuesta de (en mM): NaCl 150, KCl 2, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1 y HEPES 10. Los electrodos de parche para los experimentos de selectividad de iones contenían las siguientes cantidades (en mM): NMDG 140, EGTA 10 y HEPES 10. El baño contenía los siguientes componentes (en mM): NaCl 152, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1 y HEPES 10. De forma adicional, como test de permeabilidad, los cationes monovalentes K⁺ o NH₄⁺ se reemplazaron por sales de cloruro. Las soluciones se ajustaron al PH de 7.4 y los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20–25°C). Los datos se presentan como medias ± error estándar. La significación estadística se evaluó mediante el *Welch's t-test* para los datos distribuidos normalmente con criterios de valor de P <0,05 y P <0,01.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Trabajo 1. Prevalencia del Temblor Esencial: estudio puerta a puerta en la Comarca del Bidasoa, España.

Resultados

La población total del estudio incluyó a 2.000 sujetos de 65 años o más. Partiendo de esta muestra inicial (figura 1), resultó que 210 de ellos (10,5%) no eran elegibles debido a los errores del censo (38 casos), o por imposibilidad de contactar con ellos (23 casos), por cambio de domicilio (90 casos) y fallecimiento (59 casos). De los 1.790 sujetos restantes, el 86,03% respondió a la encuesta. Hubo 222 rechazos (12,4%), 26 estaban ausentes del domicilio en el momento de la entrevista (1,3%) y 2 hospitalizados. La Tabla 4 muestra la distribución de los valores de prevalencia por edad y sexo. La prevalencia del TE en sujetos de 65 años o más fue de 4,8% (IC del 95%, 3.6 a 6.4). La probabilidad sufrir un TE aumenta con la edad y no se observó ninguna variación en relación al sexo.

Tabla 4. Resultados

Age years	Sex	n	Screening positive	A	B	Prevalence	CI
65–74	M	401	94	58	10	4.05	1.9–7.3
	F	513	147	85	10	3.4	1.6–6.1
75–84	M	173	76	55	9	7.2	3.3–10.2
	F	308	141	97	10	4.7	2.3–8.5
≥ 85	M	39	26	15	1	4.4	0.1–22.8
	F	106	54	36	8	11.3	5.0–21.0
Total ≥65	M	613	196	128	20	4.9	3.1–7.6
	F	927	342	218	28	4.7	3.2–6.8
		1,540	538	346	48	4.8	3.6–6.4

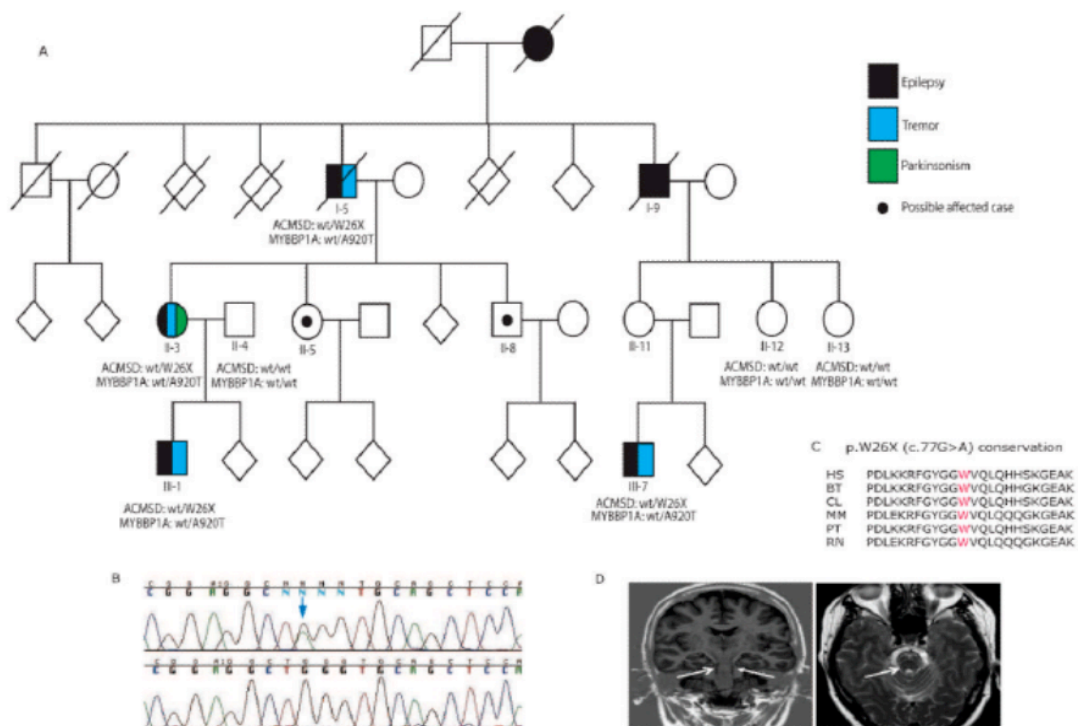
N: número de casos. A: número de casos con screening positivo y evaluación clínica (segunda fase). B: número de casos con Temblor Esencial.

6.2 Trabajo 2. El gen ACMSD, que participa en el metabolismo del triptófano, se encuentra mutado en una familia con mioclonías corticales, epilepsia y parkinsonismo.

Resultados

En este trabajo presentamos una familia que presenta una forma heterogénea de FCMTE (Figura 2). Las características clínicas de los miembros afectados incluyen crisis epilépticas y temblor postural en manos. También se objetivó en uno de los pacientes un trastorno de la marcha y postura con respuesta a levodopa.

Figura 2. Estructura del pedigrí de la familia con una forma compleja de FCMTE.



La tabla 5 incluye las principales características fenotípicas de los cuatro individuos afectados que fueron examinados (I-5, II-3, III-1 y III-7).

Tabla 5. Hallazgos clínicos y electrofisiológicos en pacientes con FCMTE en esta familia.

Patient ID	Gender	Age at follow-up	Age at onset of tremor	Age at onset of GTC	EEG	Photic	Giant SEP	Medication	Seizures frequency (Past year)
I-5	M	73	20	17	Multifocal PSW	-	N/A	PB, VPA, none	None
II-3	F	52	17	20	Focal PSW	+	15 μ V (Both sides)	VPA, LVT, L-Dopa	5 (Yearly)
III-1	M	28	N/A	17	Normal	-	-	VPA	None
III-7	M	23	23	22	Normal	Mild	-	OXCZBZ, CZP	3 partials

EEG: electroencefalograma. CTG: crisis generalizadas tónico-clónicas. SEP: potenciales evocados somatosensoriales. PSW: ondas y polipuntas. PB: fenobarbital. VPA: valproico. LVT: levetiracetam. OXCZBZ: oxcarbamacepina. CZP: clonacepam. N/A: No disponible. (+): positivo. (-): negativo.

A continuación, se describe de forma más detallada la información clínica sobre estos cuatro pacientes, tres pacientes adicionales no examinados por nosotros (I-9, II-5, y II-8), y otros tres miembros de la familia no afectados, de los cuales dos (II-12 y II-13) han sido examinados recientemente. La información clínica de los pacientes que no tuvimos oportunidad de examinar de primera mano, se recogió de las historias clínicas y mediante comunicación con los familiares de estos sujetos.

Descripción clínica de los pacientes

Paciente 1 (I-5) – A la edad de 17 años comenzó a sufrir crisis generalizadas y mioclónicas aisladas precipitadas por la privación del sueño o por la ingesta de alcohol. A los

20 años de edad se inicia el temblor de ambas manos. Las convulsiones tuvieron buena respuesta a los medicamentos, pero su temblor empeoró considerablemente después del tratamiento con valproato. A la edad de 63 años, los ataques epilépticos desaparecieron y el medicamento se suspendió. A la edad de 73 años, tenía un temblor postural de las dos manos sin ningún signo cerebeloso, rígidoacinéutico o distónico asociado. La exploración neuropsicológica era normal y no tenía intolerancia a la luz. El registro electromiográfico mostró un temblor a una frecuencia de 4-5 Hz de frecuencia con co-contracción de músculos agonistas y antagonistas. La RMN cerebral mostró un hematoma lóbulo temporal previo.

Paciente 2 (I-9) – este paciente sufría epilepsia desde la infancia sin que se hubiera recogido historia de temblor. Presentaba además diabetes y enfermedad pulmonar obstructiva crónica y falleció a la edad de 63 años por un carcinoma escamoso de pulmón.

Paciente 3 (II-3) - se trata de una mujer de 53 años de edad que sufría de temblor postural de ambas manos desde los 17 años de edad y crisis epilépticas generalizadas desde los 20. El tratamiento con valproato (2000 mg/día) fue muy eficaz para el control de las crisis, pero empeoró el temblor. A los 49 años, se quejó de trastorno de la marcha. En la exploración, se apreció hipomimia, marcha lenta con trastorno de control postural, temblor ortostático, acinesia leve y rigidez del cuello y de los brazos. Se realizó un diagnóstico de parkinsonismo iniciándose tratamiento con levodopa-carbidopa (300 mg/día). El valproato de sodio fue reemplazado por levetiracetam (2000 mg/día) reapareciendo las crisis epilépticas sin que se observara mejoría del parkinsonismo. En la última valoración realizada, tenía gran intolerancia a la luz y llevaba gafas de sol de forma permanente para evitar las crisis mioclónicas fotosensibles. Presentaba temblor, tanto en las extremidades superiores como en las inferiores, inducido por la postura y la acción. El temblor de sus manos se hizo más grave apreciándose una mayor amplitud de su componente postural y el temblor en las piernas empeoró durante el ortostatismo, aumentando su inestabilidad postural. Su andar era lento con pasos cortos y con titubeo durante los giros. Los reflejos osteotendinosos eran vivos y las respuestas plantares flexoras. Las pruebas de coordinación dedo-nariz y talón-rodilla eran normales. En la

exploración neuropsicológica mostró déficits en los test de atención, memoria y de función ejecutiva (MoCA 19/30). Su EEG mostraba complejos punta-onda de forma predominante en región fronto-temporal izquierda. Los potenciales evocados somatosensoriales eran gigantes con amplitud de 15 μ V en ambos lados. Se obtuvieron reflejos C de forma bilateral tras estimulación en el abductor corto del pulgar. El EMG de superficie mostró un temblor mioclónico en forma de ráfagas irregulares con un patrón de co-contracción de músculos agonistas y antagonistas a una frecuencia de 4-6Hz, lo que confirmó que el temblor era en realidad un mioclono que mostraba contracciones musculares irregulares periódicas de corta duración, aproximadamente 50 ms. La RMN cerebral mostró una atrofia cerebelosa leve y señales de alta intensidad en T2 y en imágenes ponderadas en *flair* en la región ventral del tronco cerebral, así como imágenes lineales bilateral hipointensas en secuencias de inversión recuperación, lo que sugiere una degeneración walleriana del tracto corticoespinal (Figura 2D).

Paciente 4 (II-5)— Es una mujer de 55 años de edad que presenta crisis epilépticas desde su infancia y que en el momento de la evaluación se encontraba sin tratamiento.

Paciente 5 (II-8)— Es un varón de 54 años que sufre epilepsia y está actualmente con tratamiento.

Paciente 6 (III-1)— Es un varón de 28 años de edad, que presentaba desde la edad de 17 años, crisis mioclónicas y generalizadas, adecuadamente controladas con valproato (1000 mg / día). A la exploración tenía un leve temblor en ambas manos, pero no mostró otra focalidad neurológica, ni trastorno de la marcha ni fotosensibilidad y era cognitivamente normal (MoCA: 30/30). Su EEG era normal sin respuesta fotosensible. Los potenciales evocados eran de amplitud normal (6 μ V)., no se obtuvieron ondas C y el EMG de superficie reveló un temblor irregular a 8-10 Hz con co-contracción de músculos agonistas y antagonistas del antebrazo. Su RMN cerebral también fue normal.

Paciente 7 (III-7): es un varón de 23 años de edad. Desde los 22 años, sufría crisis parciales secundariamente generalizadas adecuadamente controladas con oxcarbazepina

(1200 mg / día) y clonazepam (1 mg / día). Presentaba un leve temblor de manos que a veces se exacerbaba en relación a diferentes precipitantes sin llegar a ser incapacitante y refería algo de fotosensibilidad. Su RMN craneal y la puntuación en el test MoCA fueron normales (30/30). Su EEG y los potenciales evocados (2 μ V) fueron también normales. No se obtuvieron ondas C y el EMG de superficie reveló un temblor irregular a 8-10 Hz con co-contracción de los músculos agonistas y antagonistas de los músculos del antebrazo.

También estaban disponibles los registros médicos de otros tres miembros de la familia. Para el sujeto II-11 no se registró ninguna historia de temblores o epilepsia. En el caso del sujeto II-12 se informó de la existencia de alteraciones de la marcha y problemas de personalidad con discapacidad intelectual, pero no de temblor o de epilepsia. Actualmente, no está tomando ninguna medicación y su último examen neurológico reveló la ataxia leve, con arreflexia en las piernas y pérdida sensorial distal progresiva. Tenía una puntuación de 25 en el MoCA y un EEG normal. El sujeto II-13 tuvo uno o dos episodios de pérdida de conciencia a la edad de 10 años, pero a los 45 años de edad es neurológicamente normal con una puntuación en el MoCA de 30/30 y un EEG normal.

WES

Se consiguió una captura del 85% o más del exoma objetivo: el 85.68% para el paciente I-5, 85.36% para el paciente II-3, y 89.15% para el paciente III-1. Después de un adecuado filtrado para todas las variaciones genéticas comunes, se identificaron 181 SNVs no-sinónimos y 7 *nonsense* para el paciente I-5, 209 no-sinónimos y 7 *nonsense* para el paciente II-3, y 241 no sinónimos y 6 *nonsense* para el paciente III-1. De todas ellas, solamente se identificaron dos mutaciones que segregaban con la enfermedad y que además estaban altamente conservadas en otras especies y ausentes en un gran número de individuos controles (n>10.000), incluyendo 188 cromosomas emparejados por etnicidad (figura 2A). Estas variantes eran

ambas una transición de G a A que resultaban en p.Trp26Stop y p.Ala920Thr, respectivamente. Sólo la mutación p.Trp26Stop en el gen ACMSD (MIM #608889) y que codifica una α -amino- β -carboxymuconato- ϵ -semialdehído decarboxilasa, predijo patogenicidad. ACMSD es una enzima que es parte de la vía de la kinurenina de la degradación del triptófano en mamíferos y reacciona con el α -amino- β -carboxymuconato- ϵ -semialdehído (ACMS) para producir α -aminomuconato- ϵ -semialdehído (AMS). En ausencia de ACMSD, el ACMS es inestable y se convierte rápidamente en quinolinato (ácido quinolínico; QA), que es una potente excitotoxina y que participa en la patogénesis de algunas enfermedades como la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington (Guidetti et al., 2004; Lapin et al., 1978; Rahman et al., 2009; Wu et al., 1996). La mutación p.Ala920Thr se localiza en el gen MYBBP1A (MIM #604885); MYBBP1A codifica para la proteína MYB (P160) 1A, que actúa como supresor tumoral y es esencial para el desarrollo embriológico, el control del ciclo celular y la mitosis (Mori et al., 2012). Basados en la evidencia que la vía de la kinurenina está implicada en la génesis de la crisis epilépticas (Lapin, 1981) y que las alteraciones en los niveles de los metabolitos de la vía de la kinurenina han sido implicados en varias alteraciones neurológicas, incluyendo la enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Amaral et al., 2013), concluimos que la mutación en ACMSD identificada aquí es probablemente patógena y responsable del temblor mioclónico y epilepsia descritos en nuestros pacientes.

Posteriormente, debido a la proximidad de ACMSD a FCMTER2, examinamos la región codificante completa de ACMSD en dos familias en las que previamente se había ligado a este locus. Dado que el temblor es un hallazgo frecuente, también se examinaron otros 11 casos de temblor familiar y 58 esporádicos. Como algunas variantes genéticas cercanas al locus ACMSD se habían asociado previamente con un mayor riesgo para la enfermedad de Parkinson esporádica (Nalls et al., 2011), también se examinaron 54 muestras de pacientes con EP esporádica para la mutación p.Trp26Stop mediante secuenciación directa *Sanger*. No se identificó ningún portador adicional de la mutación.

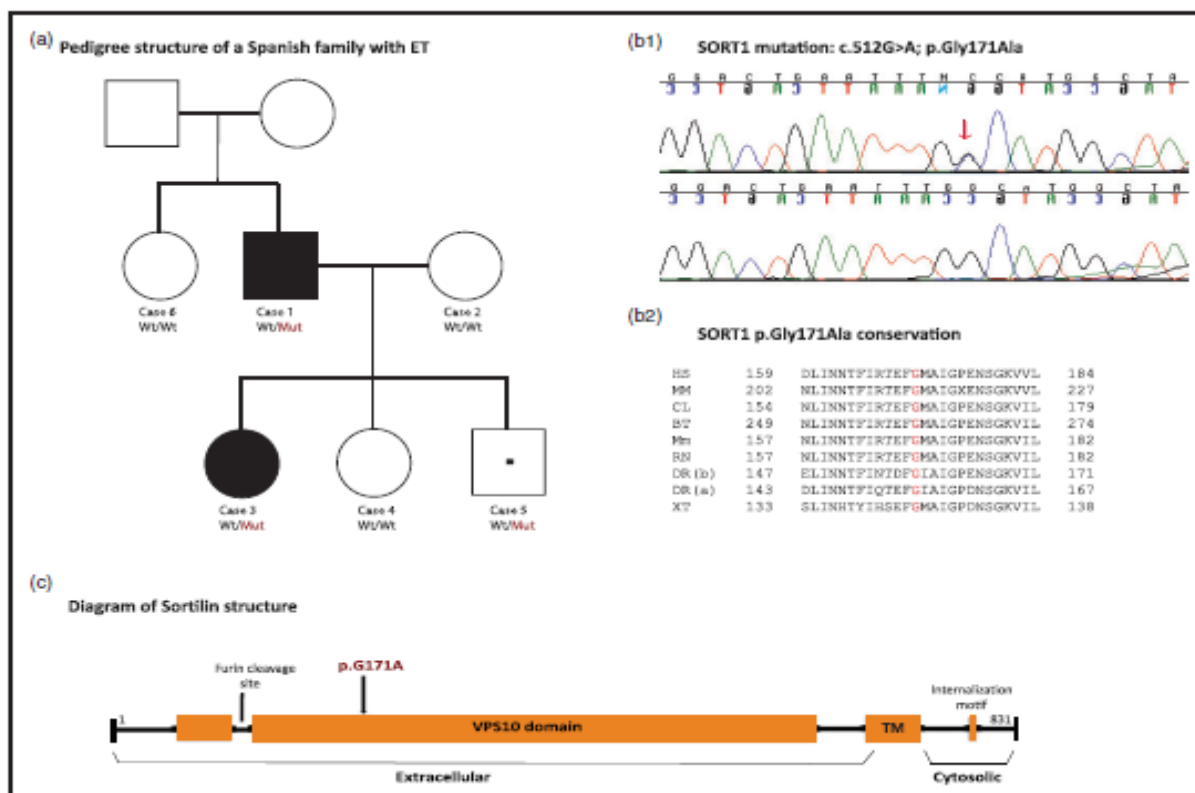
6.3 Trabajo 3. La mutación *SORT1* p. G171A descrita en una familia con temblor esencial produce deficiencia de sortilina y altos niveles de p75NTR.

Resultados

Descripción fenotípica de los miembros de la familia

La familia con TE estudiada en este trabajo consta de dos sujetos con TE que presentaban temblor en manos de inicio temprano y progresión lenta y cuatro miembros no afectados (Figura 3 (a)). Uno de los miembros no afecto presentaba síntomas de ansiedad y de depresión.

Figura 3. Árbol genealógico de la familia con TE identificada con la mutación patógena *SORT1*. (a): los casos afectados son representados con un cuadrado (varón) y el círculo (mujer) oscuros mientras un punto dentro de un cuadrado representa un varón a riesgo. Wt / Mut indica portador heterocigoto para el alelo mutante, mientras que p / p indica estado de no portador.



A continuación, se describen las características clínicas de los miembros de la familia.

Caso 1. Es un varón que fue atendido por primera vez en 2006 por un temblor postural e intencional de ambas manos sin que se objetivara temblor de voz, cefálico, ni temblor de reposo. El temblor se inició en su infancia con una progresión lenta del mismo. No presentaba otros signos sugestivos de parkinsonismo, mioclonías, distonía, ataxia ni polineuropatía, ni síntomas sugestivos de trastornos autonómicos, trastornos de sueño (insomnio, trastorno de sueño de la fase REM), ansiedad o depresión. No tomaba medicaciones específicas para el temblor, pero este mejoraba con la ingesta de alcohol. Presentaba hipercolesterolemia y había sufrido un infarto de miocardio en el año 2000 y un infarto aterotrombótico en la protuberancia en 2001. Falleció en el año 2008 a los 73 años de edad tras un hematoma subdural y hemorragia intracraneal fronto-temporal. Su puntuación en la escala de TRS era de 36 y de 27/30 en el test de MoCA (normal >25). Se muestra el dibujo de la espiral realizado con su mano derecha (Figura 4a).

Caso 2. Se trata de la esposa del caso 1 que no presentaba temblor ni otros signos neurológicos.

Caso 3. Es una mujer de 48 años de edad que sufre temblor en ambas manos desde su infancia. En la exploración mostraba un temblor postural simétrico que afectaba a manos sin evidencia de temblor de acción ni de reposo y sin afectación de voz, cabeza ni tronco. La marcha era normal y no había signos de parkinsonismo, mioclonía, distonía, ataxia ni polineuropatía. No presentaba síntomas sugestivos de trastornos autonómicos, trastornos de sueño (insomnio, trastorno de sueño de la fase REM), ansiedad o depresión. Su puntuación en la escala de TRS era de 11 y de 30/30 en el test de MoCA. LA RMN craneal era normal. El EMG de superficie mostró un temblor postural a 9.5 Hz de frecuencia y 46 mV de amplitud. Su colesterol total era de 244 mg/dl y los niveles de LDL colesterol estaban ligeramente elevados (176 mg/dl). Se muestra el dibujo de la espiral realizado con su mano derecha (Figura 4b).

Caso 4. Se trata de una mujer de 46 años de edad que refería sufrir un temblor leve de ambas manos durante su juventud cuando era consumidora habitual de tabaco, pero que mejoró de forma sustancial tras abandonar el hábito. A la exploración, no presentaba temblor y su estado cognitivo era normal (MoCA 30/30). El estudio RMN cerebral, colesterol total y niveles de LDL colesterol fueron normales.

Caso 5. Es un varón de 43 años de edad sin historia de temblor. Ni la exploración ni el registro EMG mostró temblor. El estudio RMN cerebral, colesterol total y niveles de LDL colesterol fueron normales, pero seguía tratamiento con atorvastatina a dosis de 20 mgrs/día.

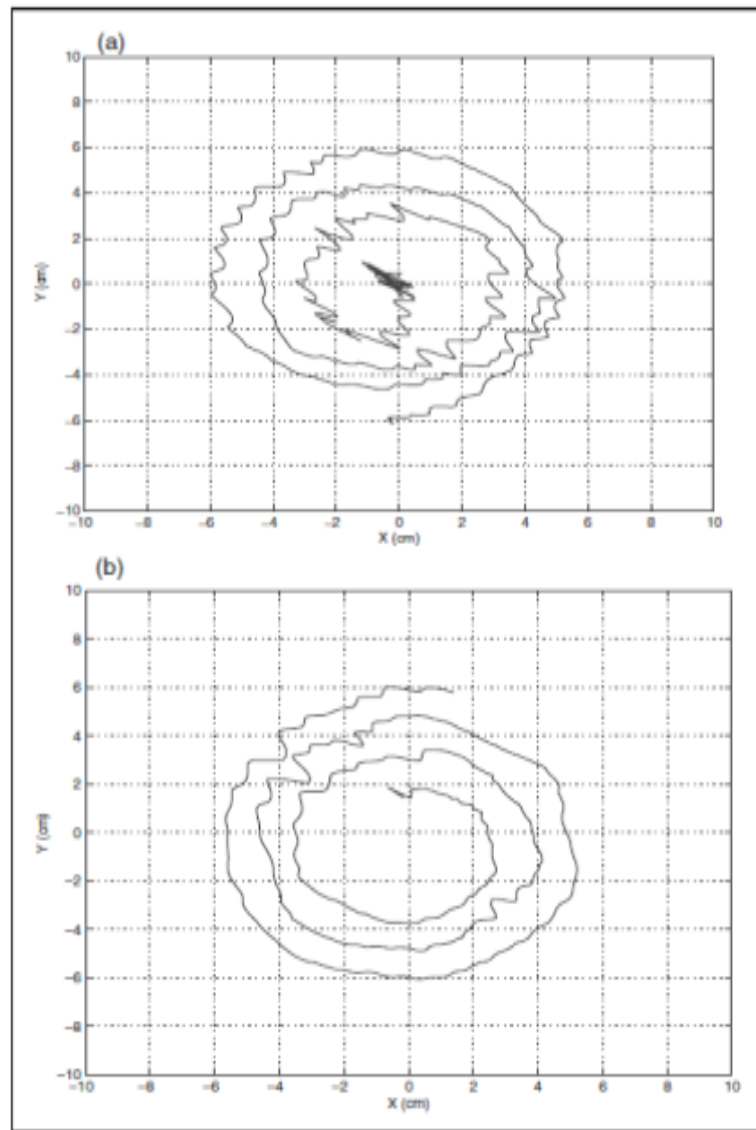
Caso 6. Es una mujer de 67 años que presentaba historia de ansiedad y depresión desde hace 15 años y seguía tratamiento con 20 mgrs/d de paroxetina. A la exploración, no presentaba temblor, su estado cognitivo (MoCA 30/30) y los niveles de LDL colesterol eran normales.

Ninguno de los casos no afectos (Casos 4,5,6) presentaron signos de parkinsonismo, mioclonías, distonía, ataxia o polineuropatía. Tampoco presentaban síntomas sugestivos de trastornos autonómicos, trastornos de sueño (insomnio, trastorno de sueño de la fase REM), ansiedad o depresión (excepto el caso 6, ya descrito).

WES y análisis subsiguientes

Se realizó un WES en cuatro de los miembros de la familia con una captura de entre el 91.33% (caso1) y el 88,3% (caso 2) del exoma objetivo. Se identificaron aproximadamente 1000 nuevos SNVs codificantes incluyendo únicamente las variantes genéticas *missense* y *nonsense*, en cada uno de los miembros de la familia que fueron secuenciados: 1062 SNVs identificados para el caso 3, 1024 para el caso 1, 1006 para el caso 2, y 884 para el caso 4. Después de un adecuado filtrado y manteniendo únicamente aquellos compartidos entre los dos individuos afectados, quedaron seis SNVs como potenciales mutaciones asociadas a la enfermedad. Dos de ellas no fueron validadas mediante secuenciación Sanger y las otras cuatro estaban también presentes en el miembro más joven de la familia (caso 5), que no

Figura 4. Espirales de Arquímedes. Espirales realizadas con la mano derecha por el caso 1 (a) y el caso 3 (b). Las espirales se recogieron en una tableta digitalizada.



estaba afectado a los 43 años de edad. Dada la variabilidad en la edad de inicio en los sujetos pertenecientes a familias con temblor esencial, cada uno de los miembros no afectados menores de 50 años deberían de ser considerados como sujetos a riesgo (Merner et al.,2012). Por lo tanto, se analizaron los cuatro nuevos SNVs en 188 cromosomas pareados por etnicidad, y

solamente uno de ellos se encontró presente en la población control. Seguidamente, se recogió y analizó una muestra adicional de DNA de un miembro no afecto (caso 6) para el estudio de estos tres SNVs restantes; se encontró que no era portador de ninguno de ellos. Posteriormente, se utilizaron cuatro programas computacionales diferentes para poder predecir la patogenicidad de los SNVs y dos ellos fueron confirmados como posibles candidatos por los cuatro programas. A pesar de que uno de ellos (p.Gly171Ala) estaba reportado a muy baja frecuencia ($5.769E-05$) en el *the Exome Aggregation Consortium (ExAC)*, que contiene datos de exoma para de enfermedades raras incluyendo enfermedades neuromusculares (Exome Variant Server, 2015), ninguno de ellos estaba descrito en la población europea. Estos dos SNVs estaban también altamente conservados en diferentes especies mientras que el otro descrito en población europea (*ExAC data*) y situado en el gen GRIN2D, que codifica una clase de receptor ionotrópico del glutamato y que ha sido asociado con susceptibilidad a la esquizofrenia en la población japonesa (Makino et al., 2005), no lo estaba. Los dos SNVs cuya patogenicidad se había predicho estaban localizados dentro de los genes LPTM5 y SORT1 (Tabla 1 del artículo original; Figura 3(b) y (c)). El gen LPTM5 codifica una proteína de membrana lisosomal que se conoce que está asociada con la regresión espontánea del neuroblastoma, la sinovitis vellonodular pigmentada, y el cáncer de pulmón (Finis et al., 2006; Cortese et al., 2008; Inoue et al., 2009). El gen SORT1 codifica la sortilina, un miembro de una familia de proteínas vacuolares celulares que se expresa en neuronas del sistema nervioso central, incluyendo neuronas corticales, del hipocampo y cerebelosas y en el sistema nervioso periférico. Se conoce que SORT1 regula la viabilidad y función neuronal mediante la regulación de la señal de transducción y el transporte proteico (Willnow et al., 2008) y se conoce que se une a proNTs para controlar la supervivencia neuronal (Nykjaer and Willnow, 2012). Sortilina, que tiene un papel multifuncional en el tráfico intracelular de polipéptidos entre el aparato de Golgi hacia vías secretoras y endocíticas (Nielsen et al., 2001; Chen et al., 2005), ha sido implicada en la enfermedad de Alzheimer y la degeneración fronto-temporal. En la enfermedad de Alzheimer, sortilina representa una vía endocítica mayor en el aclaramiento de complejos apoE/Ab (Carlo et al., 2013) y en el control del procesamiento de APP a beta-

amiloide (Gustafsen et al., 2013), mientras que en la degeneración fronto-temporal regula los niveles extracelulares de progranulina (Hu et al., 2010). La sortilina ha sido postulada como un factor de riesgo para hipercolesterolemia y el infarto de miocardio (Musunuru et al., 2010). Hay que tener en cuenta que todos portadores de la mutación SORT1 en nuestra familia, tenían niveles elevados de colesterol, sugiriendo un posible papel de la homeostasis del colesterol en la patogénesis del temblor. Se ha examinado la región codificante completa de SORT1 en 61 casos españoles de TE (13 familiares y 48 esporádicos), pero no se ha identificado ninguna mutación patogénica. También se ha analizado el exón 4 que contiene la mutación SORT1 (p.Gly171Ala) en otros 90 casos adicionales de TE (28 familiares y 62 esporádicos) y no se ha identificado ningún otro portador.

Análisis funcionales

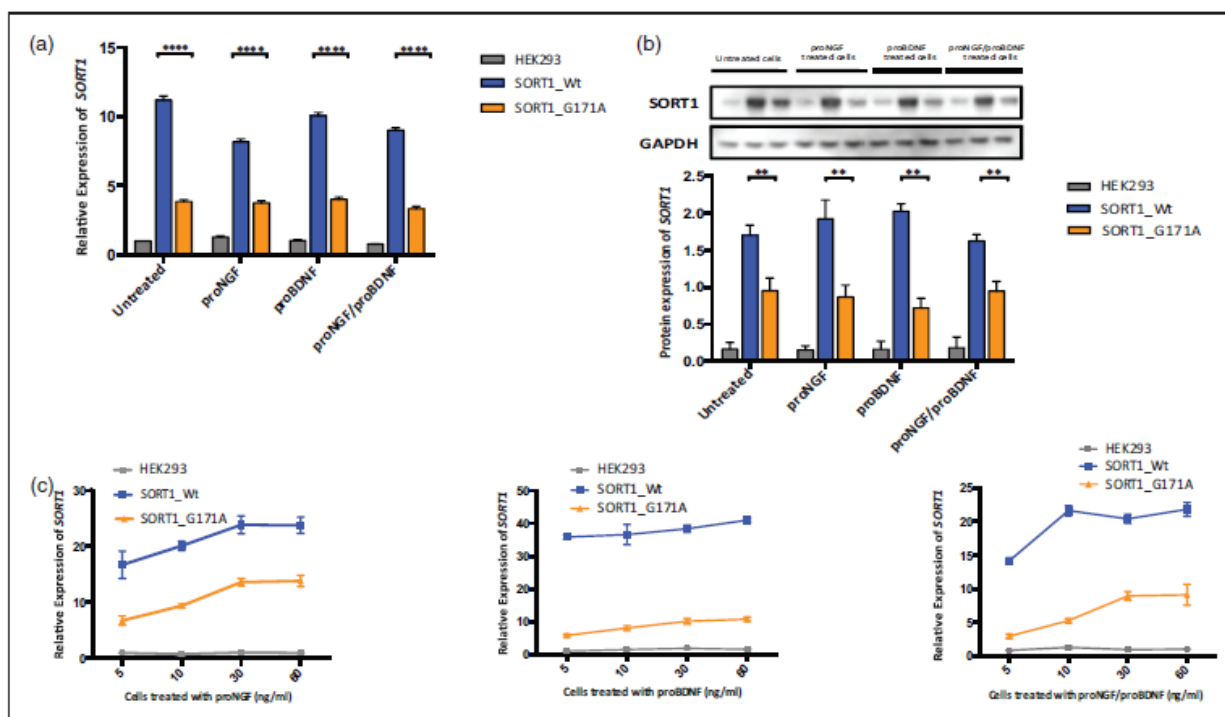
La mutación SORT1 p.G171A disminuye los niveles de RNAm y su expresión proteica.

Con el fin de probar la patogenicidad de la mutación SORT1- p.G171A, se transfectaron células HEK293 con plásmidos mutantes (p.G171A) y no mutantes y se llevó a cabo una PCR cuantitativa (qPCR) en ADN extraído de ambos tipos de células. Los niveles de RNAm de sortilina fueron unas tres veces más bajos en las células portadoras de la mutación p.G171A que en las no portadoras ($p < .0001$; Figura 5 (a)), y también se observó una disminución en los niveles de proteína de aproximadamente el doble entre las células mutantes y no mutantes ($p < .05$; Figura 5 (b)). Dado que sortilina se une a un pre-dominio de proNGF y proBDNF para regular la liberación de NGF y BDNF a las vías endocíticas y secretorias adecuadas (Chen et al., 2005), las células transfectadas fueron también tratadas con proNGF, proBDNF, y con una combinación de proNGF/proBDNF. La disminución de la sortilina fue consistente tanto en las células tratadas como en las no tratadas, sugiriendo que el tratamiento con proNTs no afecta a su expresión diferencial en relación con la mutación (Figura 5 (a)–(c)).

La expresión de RNAm p75NTR está aumentada en las células con la mutación p.G171A del gen SORT1. Dado el papel de la sortilina en la apoptosis neuronal inducida por proNGF y proBDNF vía su interacción con p75NTR (Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005) y

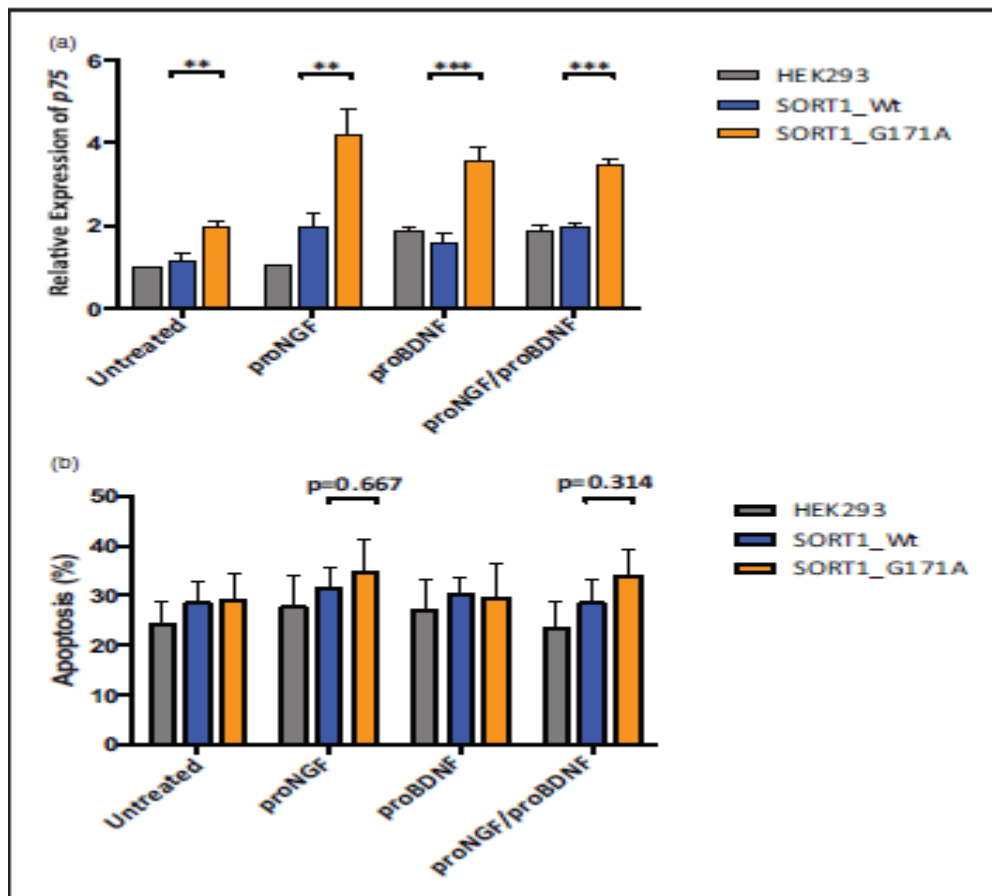
los efectos de la mutación SORT1- p.G171A en los niveles de expresión de la proteína y del RNAm, tratamos de determinar si esta mutación podría también alterar los niveles de RNAm p75NTR y los niveles de apoptosis. En primer lugar, se analizó la expresión de p75NTR en células no transfectadas mediante qPCR directa: células HEK293 que expresan p75NTR, y posteriormente se examinaron en los dos tipos de células, las no mutantes y en células con mutación SORT1. Los niveles de RNAm p75NTR estaban significativamente elevados en las células con mutación en relación con las no mutadas (Figura 6 (a); $p < .05$, $p < .01$). Este incremento fue significativamente más alto en las células tratadas con proBDNF and proNGF/proBDNF ($p < 0.01$). A pesar de que se detectó un ligero incremento en los niveles de apoptosis en las células con mutación p.G171A tratadas con proNGF y proNGF/proBDNF, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 6 (b)).

Figura 5. Expresión de SORT1 y sortilina en células no tratadas y tratadas con factores proNTs.



Las columnas grises representan células HEK293 no transfectadas, las columnas azules células HEK293 transfectadas con plásmido SORT1 wild-type, y las naranjas células HEK293 transfectadas con plásmido mutante SORT1 G171A. Los resultados de los análisis de PCR a tiempo real para la expresión de RNAm SORT1 de células HEK293 no tratadas y tratadas con proNTs se muestran en (a) (10 ng/ml) y (c) X: representa diferentes concentraciones de proNGF, proBDNF, yproNGF/proBDNF (5, 10, 30, o 60 ng/ml). (b) Análisis Western blot de sortilina y proteínas GAPDH en células lisadas obtenidas de células HEK293 transfectadas y no transfectadas con sortilina de mutada y no mutada y tras 4 días de cultivo en ausencia y presencia de 10 ng/ml de proNGF, proBDNF, y una combinación de proNGF/proBDNF. Se muestran la longitud completa de (90 KDa) y de la proteína GAPDH (37KDa) que fueron utilizadas como controles. Los resultados son representativos de tres experimentos. Los valores representan la media \pm SEM. **** $p < .0001$, mientras que ** $p < .05$.

Figura 6. Niveles de expresión de mRNA P75NTR y porcentaje de muerte celular por apoptosis en células con la mutación SORT1 p.G171A y células no mutantes.

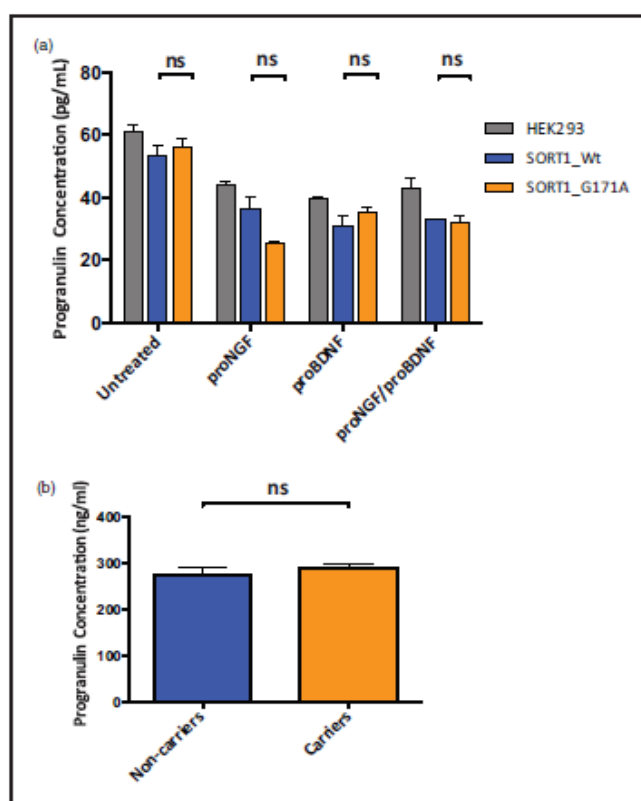


Las columnas grises representan células HEK293 no transfectadas, las columnas azules células HEK293 transfectadas con plásmido SORT1 wild-type, y las naranjas células HEK293 transfectadas con plásmido mutante SORT1 G171A. (a) Cuantificación relativa de la expresión de RNAm p75NTR en células HEK293 no transfectadas y transfectada con alelos mutados SORT1 y no mutados. Y: expresión relativa del gen objetivo (P75NTR) con respecto al gen de control interno (B2M); X: células no tratadas y tratadas con diferentes proNTs (10 ng/ml). (b) Porcentaje de apoptosis en células no transfectadas y transfectadas con mutación SORT1 y no mutadas. Y: porcentaje de células con apoptosis temprana; X: diferentes tratamientos con proNT. *** $p < .01$, ** $p < .05$.

Los niveles de PGRN no están alterados en las células con la mutación SORT1Lp.G171A ni en los portadores humanos afectados. Un área de investigación muy interesante es el papel de la función de la sortilina en el metabolismo de PGRN dado que se ha demostrado que la sortilina regula los niveles extracelulares de PGRN in vivo (Hu et al., 2010) e in vitro (Lee

et al., 2013). Por ello, se han medido los niveles de PGRN con *ELISA* con objeto de determinar si la mutación p.G171A del gen SORT1, que regula a la baja los niveles de RNAm de SORT1 así como los niveles de la proteína y regula al alza los niveles RNAm p75^{NTR}, pudiera estar también asociada con un incremento en los niveles de PGRN en muestras de cultivo y muestras de suero humanas. No hemos encontrado diferencias entre los niveles de PGRN entre las células con y sin mutación (Figura 7 (a)) ni entre los portadores de la mutación p.G171A del gen SORT1 y los no portadores ($p= 0.65$; Figura 7 (b)).

Figura 7. Expresión de progranulina en células HEK293 y muestras de suero humano.



- (a) Niveles de PGRN en células. Las columnas grises representan células HEK293 no transfectadas, las columnas azules células HEK293 transfectadas con plásmido SORT1 wild-type, y las naranjas células HEK293 transfectadas con plásmido mutante SORT1 G171A. Los valores de la gráfica representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.
- (b) Niveles de PGRN en suero humano. La columna azul representa los niveles de PGRN para no portadores de SORT1- p.G171A mientras que la columna naranja muestra los niveles de PGRN para portadores de p.G171A. Los valores de la gráfica representan la media \pm SEM de muestras duplicadas de cada individuo. Los análisis estadísticos han sido realizados con software GraphPad. Se ha realizado el test no paramétrico de Mann-Whitney. ns=no significativo.

6.4 Trabajo 4. La mutación de SCN4A contribuye a la patogénesis de una forma de temblor esencial autosómico dominante y puede aumentar la susceptibilidad a la epilepsia

Resultados

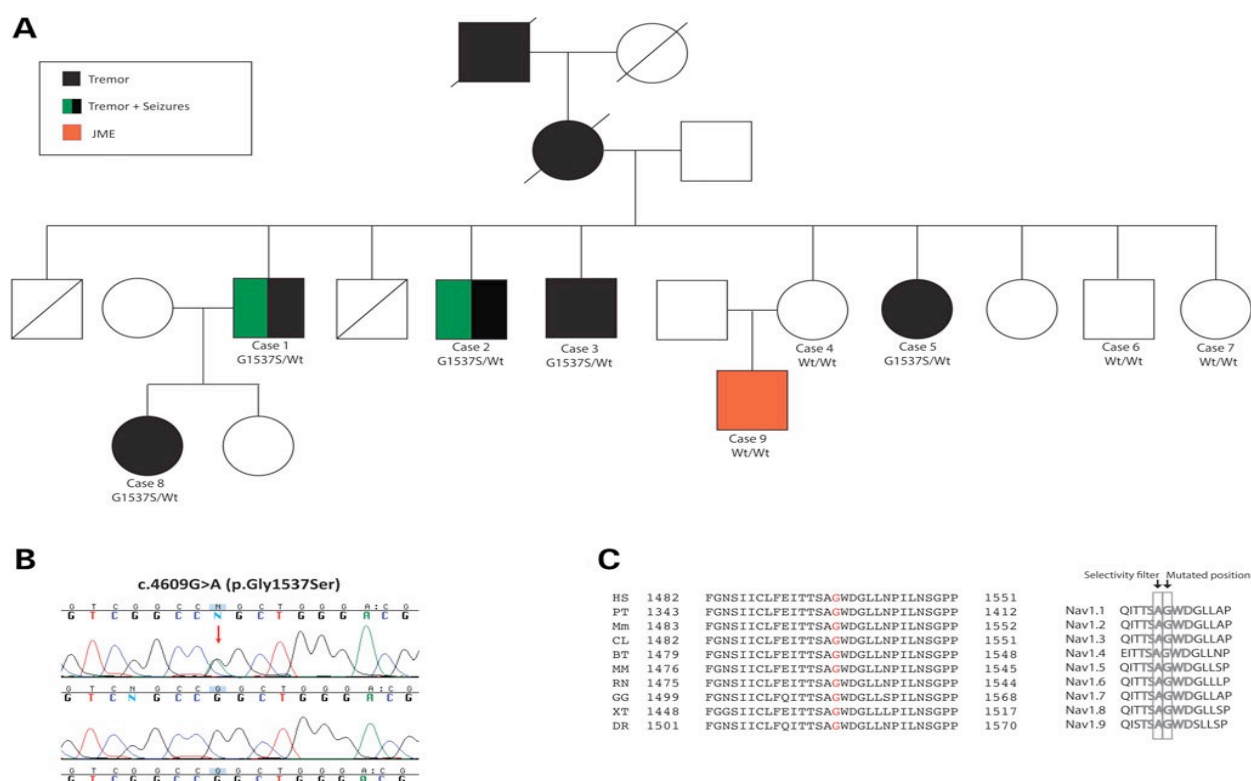
Examen clínico

En este trabajo se estudió una familia con TE en la que dos de los individuos afectados también manifestaban epilepsia. El patrón de herencia era autosómica dominante. Se detectaron siete individuos afectados en cuatro generaciones, y se pudo llevar a cabo una evaluación clínica completa en cinco de los pacientes (pacientes 1-5) y en otros tres miembros de la familia no afectados (figura 8A). Dos de los sujetos de los que se conocía que sufrían TE no fueron examinados ni se pudo conseguir su ADN (figura 8A).

Caso 1

Es el paciente nº1, de 73 años, que comenzó a sufrir crisis generalizadas precipitadas por la privación del sueño a la edad de 10 años. A los 30 años, desarrolló el temblor en las manos. En el examen físico, mostró temblor postural de ambas manos, temblor cefálico, temblor de reposo suave y una marcha atáxica leve sin otros signos cerebelosos, rígidoacinéuticos o distónicos. El temblor le incapacitaba para escribir y beber. El electroencefalograma no mostró cambios patológicos en reposo ni fotosensibilidad. Los potenciales evocados somatosensoriales mostraron una amplitud normal y no se obtuvieron ondas-C. El registro EMG en brazos mostró un temblor a 8 Hz de frecuencia y 48–385 μ V de amplitud con cocontracción de músculos agonistas y antagonistas (Figura. 5D y E). La puntuación en el test de MoCA fue de 27 y de 36 en la escala de temblor de Fahn-Tolosa-Marín (TRS).

Figura 8. Familia con TE autosómica dominante debido a una mutación SCN4A (A) Estructura del pedigrí. Heterocigotos portadores de mutaciones se representan como G1537S / WT y no portadores como p / p.



Caso 2

Es el paciente nº2, de 71 años, que comenzó a sufrir de crisis epilépticas generalizadas aisladas precipitadas por la ingesta de alcohol a la edad de 20 años. Fue tratado con fármacos antiepilépticos hasta hace aproximadamente 20 años, y desde entonces, no ha presentado nuevas crisis. Tenía mioclonías aisladas y desde 2005 presenta temblor en ambas manos que mejora con la ingesta de alcohol. Posteriormente desarrolló temblor cefálico. En la exploración, se apreció un temblor postural en ambas manos y temblor cefálico, pero ningún otro signo cerebeloso, rígidoacinéptico o distónico. A pesar de que su temblor en manos le incapacita para la escritura y para beber, no tomaba ninguna medicación. El EMG registrado en los brazos mostró un temblor a 3.5 - 4.5 Hz de frecuencia y 66-503 mV de amplitud con cocontracción de

músculos agonistas y antagonistas. La puntuación en el test de MoCA fue de 25 y de 40 en la TRS.

Caso 3

Es el paciente nº3, de 69 años, que presenta un temblor simétrico en las manos desde la edad de los 62 años. Inicialmente era un temblor postural y de acción y posteriormente desarrolló un temblor de voz. El EMG registrado en los brazos mostró un temblor a 6,6 Hz de frecuencia y 298 mV de amplitud con cocontracción de músculos agonistas y antagonistas. La puntuación en el test de MoCA fue de 26 y de 29 en la TRS.

Caso 4

Se trata del miembro no afecto nº1, de 68 años de edad que tenía un historial de ansiedad crónica, sin evidencia de ataques epilépticos o temblores. En la exploración no mostró ningún tipo de temblor.

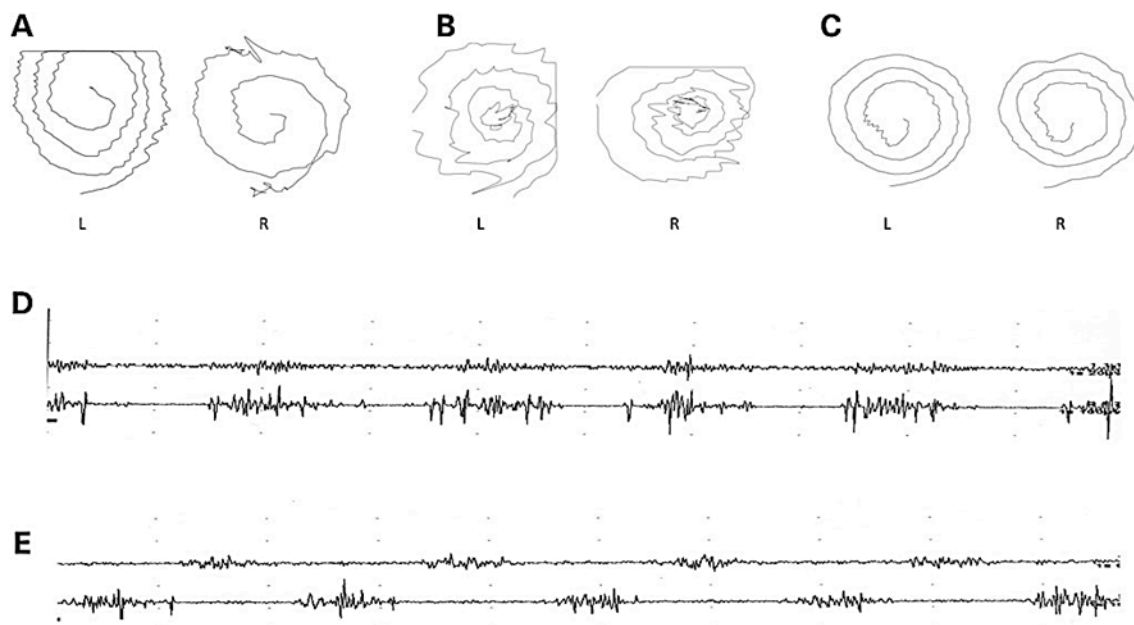
Caso 5

Es la paciente nº4, de 66 años, que sufre un temblor en ambas manos ligeramente asimétrico, más intenso en la mano derecha lo que le provoca una imposibilidad para la escritura desde los 54 años de edad. En la exploración se objetivó además un temblor cefálico leve pero ningún otro signo cerebeloso, rígidoacinéutico o distónico. En el EEG no se observaron cambios patológicos en reposo, ni fotosensibilidad. El EMG registrado en los brazos mostró un temblor de 6 Hz frecuencia y 15,8 mV de amplitud con cocontracción de músculos agonistas y antagonistas. La puntuación en el test de MoCA fue de 25 y de 16 en el TRS.

Caso 6

Miembro no afecto nº 2, de 61 años de edad, tiene antecedentes de diabetes, cardiopatía isquémica, depresión, ansiedad y abuso del alcohol. No ha presentado crisis epilépticas ni temblor y en la exploración no se registró ningún tipo de temblor. La puntuación en el test de MoCA fue de 15

Figura 9. Muestras del dibujo de la espiral Arquímedes y registros EMG de un paciente con TE descritos en este estudio. Los registros del EMG (D y E) corresponden a un sujeto (sujeto 1) En cada una de las líneas, el registro superior corresponde al bíceps y el inferior al tríceps. Muestran un temblor con patrón sincrónico en reposo (D) y un patrón alternante con los brazos extendidos (E).



Caso 7

Miembro no afecto nº 3, de 59 años de edad, sin antecedentes de ataques epilépticos o temblores y cuya exploración fue normal. La puntuación en el test de MoCA fue de 25

Caso 8

Es el paciente nº 5, de 48 años de edad, sufre temblor cefálico desde que empezó a fumar tabaco a la edad de 23 años. En la exploración, se apreciaba un temblor leve en la cabeza sin temblor de voz ni de las extremidades y sin evidencia de ataques epilépticos.

Caso 9

Es el paciente nº 6, de 48 años de edad, que comenzó a sufrir de sacudidas mioclónicas a la edad de 15 años. En 2003, también sufrió una crisis generalizada tras privación del sueño y un EEG registrado en ese momento mostró descargas punta-onda

generalizadas. Sus crisis respondieron al tratamiento con valproato, pero durante el tratamiento experimentó un temblor distal de manos con amplitud creciente al final del movimiento en la prueba de dedo-nariz. El EMG registrado en los brazos mostró un temblor con un patrón alternante a 10 Hz de frecuencia, probablemente secundario al tratamiento con valproato, dado que mostraba las características típicas del temblor inducido por este fármaco, tales como una alta frecuencia y baja amplitud, duración de la ráfaga corta y un patrón de presentación síncrono (Mehndiratta et al., 2005), por lo que se le diagnosticó de una epilepsia mioclónica juvenil (EMJ).

Identificación de SCN4A como el gen causante de la enfermedad

Se realizaron análisis WES en cuatro miembros de la familia (casos 2, 4, 8, 9), incluyendo dos casos afectados con TE (casos 2 y 8), un caso diagnosticado con EMJ (Caso 9) y un caso no afectado (Caso 4; Figura 8A). Se consiguió una captura del exoma objetivo entre el 92,09% (Caso 8) y 89,12% (Caso 2) para todas las muestras secuenciadas. Incluyendo únicamente las nuevas variaciones codificantes *missense* y *nonsense*, se identificaron 972 SNVs (*single nucleotide variations*) para el caso 9, 969 para el caso 2, 942 para el caso 4 y 949 para el caso 8. Debido a que su madre no presentó ningún signo clínico, consideramos que el individuo con EMJ también pudiera ser portador de las mismas mutaciones patógenas, pero con una penetrancia reducida, por lo que se realizaron búsquedas de variaciones comunes entre los cuatro miembros de la familia secuenciados, pero no se logró identificar ninguna variación genética de este tipo. A continuación, se realizaron búsquedas de variaciones genéticas comunes entre los dos pacientes con TE (pacientes 2 y 5; Figura. 4A) y se identificaron siete nuevos SNVs comunes a ambos. Después de la validación, mediante secuenciación *Sanger*, y examen de estas nuevas variantes genéticas en los restantes miembros de la familia, sólo una de ellas segregaba con la enfermedad (figura 8B). Esta mutación que segrega con la enfermedad, daba lugar a una transversión G-A en el nucleótido 4609 y producía una mutación p.Gly1537Ser que fue localizada en el gen SCN4A que codifica

la proteína (Nav1.4) del canal de sodio voltaje dependiente. Se encontró además que la mutación Nav1.4- p.Gly1537Ser no sólo estaba conservada en otras especies, sino también en los genes humanos de las subunidades α de los canales de sodio dependientes de voltaje (SCN) (Figura 8C). Posteriormente se comprobó su ausencia en la población normal, incluyendo los controles de bases de datos públicas ($n > 10\ 000$) y controles emparejados por etnicidad ($n > 188$). Su patogenicidad se predijo por el *software Alamut* y otros dos métodos computacionales adicionales (MutPred score = 0.999; SNPs&Go score = Disease). Mientras se escribía este artículo, hemos podido observar que esta variante está actualmente listada en *dbSNP* (rs571210585) pero sin datos de validación o frecuencia y que aparece con muy baja frecuencia (6.63×10^{-5} ; 8/120 668) en el *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*, que contiene datos de exomas para una variedad de enfermedades raras, incluyendo enfermedades neuromusculares (Exome Aggregation Consortium, 2015). Esta frecuencia es consistente con la enfermedad, dado que la prevalencia del TE en la población general es de aproximadamente 4.6% en individuos mayores de 65 años (Louis & Ferreira, 2010).

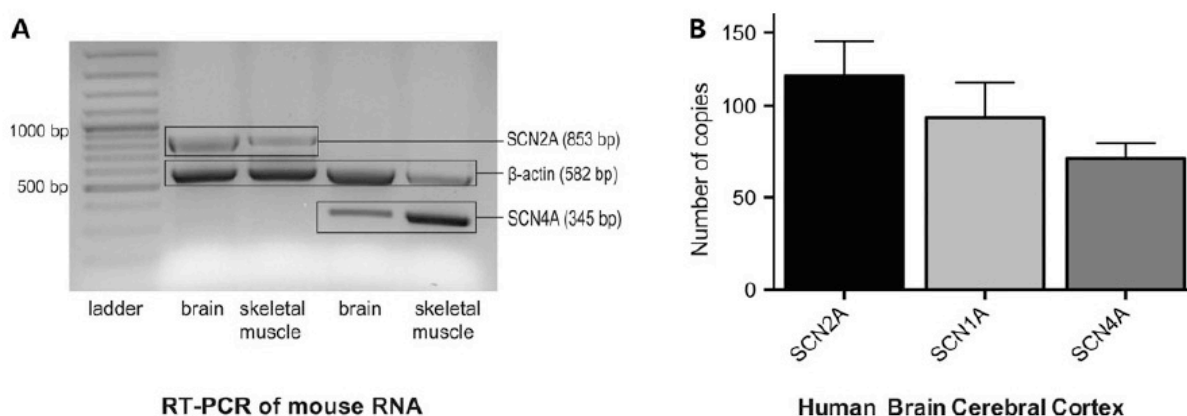
Aunque las mutaciones en SCN4A (MIM # 603967) son conocidas por causar normo- (*NormoKPP*), hiper- (*Hyper KPP2*) y parálisis periódica hipocaliémica tipo 2 (*Hypo KPP2*), paramiotonía congénita, síndrome miasténico y laringoespasma episódico neonatal grave, la variabilidad genética de SCN4A no había sido asociada con el desarrollo de temblor (Venance et al., 2004; Fontaine et al., 1990; Brunklaus et al., 2014; Lion-Francois et al., 2010; Ptacek et al., 1992; Tsujino et al., 2003). Por otra parte, se han descrito numerosas mutaciones patogénicas de otros genes de la familia SCN en síndromes epilépticos (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN5A, SCN8A) y en defectos de conducción cardíaca (SCN1A, SCN3A, SCN5A) (Brunklaus et al., 2014). De hecho, el aminoácido p.Gly1537 está mutado, tanto en la proteína SCN1A (P.Gly1725Cys) como en la SCN5A (p.Gly1712Ser), causando el síndrome de Dravet (MIM # 601144) y el síndrome de Brugada (MIM# 607208), respectivamente (Walsh et al., 2014). Tomados todos estos datos en conjunto, es muy probable que la mutación p.Gly1537Ser del gen SCN4A sea la mutación asociada a la enfermedad responsable del fenotipo de temblor se describe en nuestra familia. Posteriormente se examinó la mutación

SCN4A-p.Gly1537Ser en 76 casos de TE esporádico y 25 casos de TE familiar, pero no fue detectada. También se examinó toda la región codificante del gen SCN4A en 22 casos adicionales con TE familiar, pero no se encontró ninguna otra mutación patogénica.

El gen SCN4A se expresa tanto en el ratón como en el cerebro humano

Debido a que se considera que, en general, SCN4A se expresa específicamente en el músculo esquelético (Catterall et al., 2005), en primer lugar testamos su expresión en el cerebro de ratón en comparación con el músculo esquelético. Utilizamos como control el gen SCN2A, que codifica un canal de sodio neuronal clásico, y todas las mezclas reactivas contenían *primers* ACTB que codifican β -actina para verificar la reactividad de los reactivos. SCN2A y SCN4A eran amplificables tanto del músculo como en el cerebro (figura 10A). La expresión de SCN4A fue confirmada en el córtex cerebral humano (figura 10B), lo que sugiere fuertemente una expresión relevante de Nav1.4 en tejidos neuronales.

Figura 10. Expresión del gen SCN4A en cerebro de ratón y humano.



(A) Expresión en cerebro de ratón. Columna 1: 100 bp ladder; Columna 2: múltiples productos de RT-PCR de SCN2A y ACTB de RNA cerebral; Columna 3: múltiples productos de RT-PCR de SCN2A y ACTB a partir de RNA muscular; Columna 4: múltiples productos de RT-PCR de SCN4A y ACTB a partir de RNA de cerebro; Columna 5: múltiples productos de RT-PCR de SCN4A y ACTB RNA de músculo (columna 5). A tener en cuenta que SCN2A y SCN4A se expresan tanto en músculo esquelético y cerebro. (B) Expresión en cerebro humano. Se evaluó la expresión de SCN4A y otros genes SCN previamente conocidos por ser expresados en el cerebro humano mediante cuantificación absoluta usando el método de la curva estándar. Y: la expresión de RNAm (en número de copias); X: expresión de los genes SCN2A, SCN1A y SCN4A en la corteza cerebral del cerebro humano.

La mutación p.G1537S del gen SCN4A no afecta a la cinética del canal dependiente de voltaje, pero altera la selectividad de los iones.

La mutación SCN4A identificada en nuestra familia (p.G1537S) está situada en la porción del bucle IVS5-S6 que se sumerge en la membrana y forma el revestimiento del poro, que es importante para la selectividad de iones (Terlau et al., 1991; Heinemann et al., 1992). Con el objetivo de testar una posible relación funcional de p.G1537S en el contexto del fenotipo de TE, se realizaron estudios *whole-cell patch-clamp* en un sistema de expresión heterólogo. El aumento de la activación del canal mediante una despolarización de 12,5 ms desde el potencial de mantenimiento de -140 mV, produjo una corriente de sodio hacia el interior similar al no mutado (Figura 11A y B). A partir de la corriente máxima, se determinaron los parámetros de activación de estado estacionario mediante el ajuste de la relación corriente-tensión con la ecuación $I = G_{max} \cdot (V - V_{rev}) / (1 + \exp((V_{0.5} - V)/k))$, donde V_{rev} y G_{max} son el potencial de inversión y la conductancia máxima de canales respectivamente; $V_{0.5}$ es el potencial para la corriente media-máxima; V es el potencial del test y k es el factor de pendiente. Aunque había una tendencia en los canales mutados hacia un umbral más bajo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de activación entre el tipo mutante y salvaje (Figura 11C y Tabla 6).

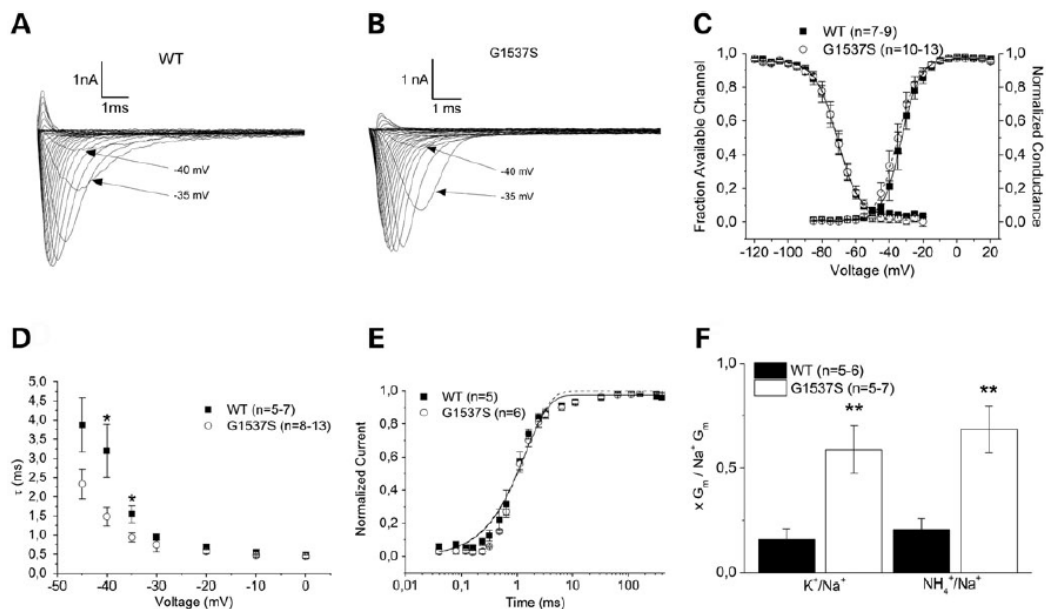
A partir del mismo conjunto de datos, se obtuvieron las constantes de tiempo de inactivación rápida (τ_h) mediante el ajuste de una sola función exponencial a la reducción de la corriente, $i = \exp(-t / \tau_h) + C$, en el que t es el tiempo y C es la asíntota. Para la mayoría de los rangos de voltaje, no hubo diferencias significativas en τ_h ; sin embargo, cerca del umbral a -40 y -35 mV, los canales mutantes eran inactivados significativamente más rápidamente que los no mutados, $1,48 \pm 0,25$ ms frente a $3,2 \pm 0,69$ ms (-40 mV) y $0,94 \pm 0,12$ frente a $1,54 \pm 0,22$ ms (-35 mV) con $P < 5\%$ (Figura 11D). Además, se encontró una tendencia hacia la activación más rápida de los canales mutantes (Tabla 6). Esta activación más rápida que ocurre en el rango de voltaje cercano al umbral (flechas en la Figura 11A y B) puede contribuir

a la disminución gradual de la amplitud de las series de potenciales de acción repetitivas durante las oscilaciones neuronales que son típicos para el temblor. La inactivación en estado estacionario fue examinada mediante un grupo de 50 ms de pulsos de prueba desde los -120 mV a los +20 mV siguiendo a un periodo de inactivación de 100 ms prepulso a -10 mV. Las funciones de Boltzmann se ajustaron a los datos por la ecuación $I / I_{max} = A / (1 + \exp((V_{0.5} - V) / k)) + C$, donde V representa el potencial pre-pulso, $V_{0.5}$ representa el potencial en el cual la mitad de los canales se inactivan, C representa la fracción de canales no inactivados y k representa el factor de pendiente. Ninguno de estos parámetros difería significativamente entre mutantes y no mutantes (Figura 11C y Tabla 6).

Se determinó la recuperación desde un estado inactivación rápida utilizando un protocolo de doble pulso variando los tiempos de repolarización intermedia a -140 mV con una inactivación de 100 ms seguido de un pulso de prueba a 50 ms, ambos al mismo potencial de -10 mV. La recuperación de la inactivación se analizó ajustando los datos con una función exponencial sencilla, $I / I_{max} = A * (1 - \exp(-t / \tau))$, donde τ es una constante de tiempo, A la amplitud fraccionada y C el nivel de la corriente de sodio no-inactivadora. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de estos parámetros (Figura 11E y Tabla 6).

Debido a la proximidad de la mutación de p.G1537S al filtro de selectividad Nav1.4 del dominio IV en la posición A1536, realizamos experimentos de selectividad para iones monovalentes mediante el intercambio del ion del baño permeable (sodio) por potasio y amonio y eliminando todos los iones permeables de la pipeta. Utilizando el mismo protocolo de activación y el ajuste Boltzmann como se describe anteriormente, se calcularon los cocientes de la conductancia máxima (G_{max_K} / G_{max_Na} y G_{max_NH4} / G_{max_Na}) para los tipos mutante y no mutante (Figura 11F). En ambos casos, las conductividades relativas fueron significativamente mayores para el tipo mutante; un factor de 3.2 - 3.9 para de amonio ($0,68 \pm 0,11$ frente a $0,21 \pm 0,5$) y para el potasio ($0,59 \pm 0,11$ frente a $0,15 \pm 0,5$), ambos con $P < 1\%$ y $n = 5-7$. Estos resultados sugieren que la mutación p.G1537S del gen SCN4A comporta un cambio de función del canal de sodio.

Figura 11. Estudio funcional.



(A y B) Se muestran las corrientes de sodio expresadas de forma heteróloga para los canales Nav1.4 no mutado (A) y con mutación G1537S (B). Se observa la cinética más rápida del canal mutante a potenciales cercanos al umbral, tal y como se destaca mediante las flechas. (C) Relación entre conductancia-voltaje tras ajuste Boltzmann de la activación e inactivación del estado estacionario, que son similares para el tipo no mutado y el mutante. (D) Cinética de inactivación determinada por ajuste monoexponencial. Obsérvese la aceleración significativa de la inactivación del canal mutante a -40 y -35 mV. (E) Recuperación desde la inactivación rápida determinada por un único ajuste exponencial, que era similar para el tipo no mutado y el mutante. (F) Conductancia relativa máxima a partir de soluciones que contienen K⁺ o NH₄⁺ normalizada a la máxima conductancia de Na⁺, calculado a partir del ajuste Boltzmann. Obsérvese el aumento de 3.2- a 3.9 veces de la conductancia relativa de los canales mutados. Todos valores en las barras representan las medias ± SEM. Los valores de p son * <0,05 y ** <0,01.

Tabla 6. Parámetros de ajuste del estudio funcional

	Parameters	WT	±SEM	G1537S	±SEM
Activation <i>n</i> = 7–9	G_{\max} (pA/mV)	42.48	5.26	43.58	5.14
	V_{rev} (mV)	61.93	3.77	59.98	4.17
	$V_{0.5}$ (mV)	-33.07	2.15	-35.24	2.05
	k (mV)	4.32	0.64	4.01	0.55
Time to peak at -45 mV (ms)		2.67	0.5	2.12	0.29
Inactivation <i>n</i> = 8	A	0.92	0.01	0.97	0.02
	$V_{0.5}$ (mV)	-71.54	2.03	-70.47	1.61
	k (mV)	-5.45	0.20	-5.93	0.24
	C	0.04	0.01	0.01	0.02
Recovery <i>n</i> = 5–6	A	0.97	0.02	0.99	0.00
	τ (ms)	1.40	0.21	1.55	0.13

DISCUSIÓN

7. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION

Los trabajos presentados en la memoria de esta tesis doctoral son parte de una línea de trabajo que parte de la epidemiología clínica, que utiliza herramientas moleculares y pretender devolver a la clínica fenotipos más perfeccionados y herramientas conceptuales que ayuden a identificar y tratar a los pacientes con temblor. En estos trabajos se pretende resaltar también la importancia del estudio genético mediante técnicas de secuenciación de nueva generación para la caracterización molecular de los casos familiares del temblor esencial. Dada la enorme proporción de casos de temblores familiares en los que no se conoce su mutación causal y el bajo impacto en cuanto a su volumen de las variantes identificadas hasta la fecha, hay que considerar que un gran porcentaje de la heredabilidad del TE está todavía sin explicar.

Tras la constatación de la marcada heterogeneidad etiológica, clínica, patológica y en la respuesta farmacológica en los pacientes con TE, hay una tendencia cada vez más importante que apunta a la idea de que el TE tal y como lo entendemos actualmente constituye una “familia de enfermedades” más que una entidad única. Aunque quedan todavía numerosas preguntas por contestar, los resultados presentados en esta tesis doctoral se alinean con dicha hipótesis.

A continuación, discutimos los resultados de los cuatro trabajos incluidos en esta tesis doctoral en las que hemos identificado dos nuevos genes implicados en la patogénesis del TE y otro en el temblor mioclónico cortical familiar estudiando familias con temblor mediante secuenciación del exoma.

En el trabajo numero 1 (Prevalence of Essential Tremor: A Door-to-Door Survey in Bidasoa, Spain) estudiamos la prevalencia del temblor esencial en sujetos mayores de 65 años mediante un estudio de diseño poblacional en dos fases realizado en la comarca del Bidasoa (Guipúzcoa) y comparamos los resultados obtenidos con los estudios epidemiológicos realizados con un diseño similar publicados hasta la fecha. Encontramos una prevalencia del TE del 4.8% en esta población. La prevalencia aumenta con la edad y tiene una distribución similar entre hombres y mujeres. Las diferencias regionales que han sido descritas en los estudios realizados con anterioridad se achacaron a las diferencias poblacionales o incluso étnicas, aunque, en su conjunto es más probable que fueran consecuencia de la variabilidad de los métodos utilizados. Los tres elementos metodológicos diferenciales más importantes de los estudios epidemiológicos son: (1) la estrategia para la determinación de casos (2) la definición y criterios diagnósticos del TE y (3) el grado de respuesta de la población elegible. La

metodología que utilizamos en nuestro estudio fue la de un diseño puerta a puerta en dos fases. Este era el *gold standard* aceptado en los estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de enfermedades neurológicas. De hecho, las prevalencias estimadas derivadas de este tipo de estudios eran mayores que aquellas obtenidas por medio de otros métodos distintos en poblaciones comparables. Sin embargo, nuestro estudio tenía algunas limitaciones. Primero, en el estudio de validación previo, la sensibilidad del instrumento de screening resultó del 75% y segundo, el 35% de los sujetos que resultaron seleccionados en la primera fase no pudieron ser examinados en la segunda. Este tipo de problemas metodológicos estaban presentes en estudios similares realizados en aquella época (Louis et al., 1995; Routakorpy et al., 1982). Además, en nuestro estudio utilizamos criterios diagnósticos más restrictivos (Louis et al., 1998) que los utilizados en otros estudios (Deuschl et al., 1998a), y quizás estos sean los motivos por los cuales nuestras cifras de prevalencia fueran un poco menores que las de otros estudios con metodología similar.

En un metaanálisis publicado posteriormente a nuestro trabajo (Louis & Ferreira, 2010) se pone de manifiesto que el TE es una de las enfermedades neurológicas más prevalentes, aunque las cifras obtenidas son muy variables, haciendo que la estimación precisa de la prevalencia sea difícil. Tras revisar 28 estudios poblacionales, la prevalencia global (todas las edades) fue del 0.9%, con una heterogeneidad estadísticamente significativa entre los resultados ofrecidos por los diferentes estudios. La prevalencia aumenta con la edad siendo la prevalencia para mayores de 65 años de 4.6% y de 21.7% para los mayores de 90 años. Algunos de los estudios muestran diferencias entre los distintos grupos étnicos (Aharon-Peretz et al., 2012) y hasta en un tercio de ellos diferencias entre géneros, con un aumento de prevalencia en los varones. Esta diferencia en relación al género es interesante cuando se valora la asociación clinicopatológica entre el TE y la EP.

De la variabilidad de los datos de prevalencia que arrojan estos estudios se pueden sacar algunas conclusiones de interés: (1) que las diferencias en el diseño de los estudios pueden explicar en parte la variabilidad de los datos y hay que valorarlos en ese contexto. Por una parte, los estudios poblacionales son los que proporcionan las estimaciones más válidas. Además, parece útil el separar los datos según dos tipos de poblaciones, uno basado en los datos en sujetos de todas las edades y otra basada en la población de más edad (por ejemplo., mayores de 65 años) porque podrían mostrar indicios de diferencias etiofisiopatológicas entre ambas. (2) que los criterios diagnósticos utilizados son fundamentales para explicar, en parte, esta variabilidad. (3) que algunos de los estudios sugieren la existencia de diferencias étnicas en la prevalencia del temblor. Este dato junto con el descubrimiento previo de la existencia de mutaciones aisladas en diferentes genes decisivos para el conocimiento de diferentes enfermedades genéticas dominantes y recesivas del sistema nervioso central y periférico, hace que se abra un campo de investigación en la etiopatogenia de la enfermedad que es el

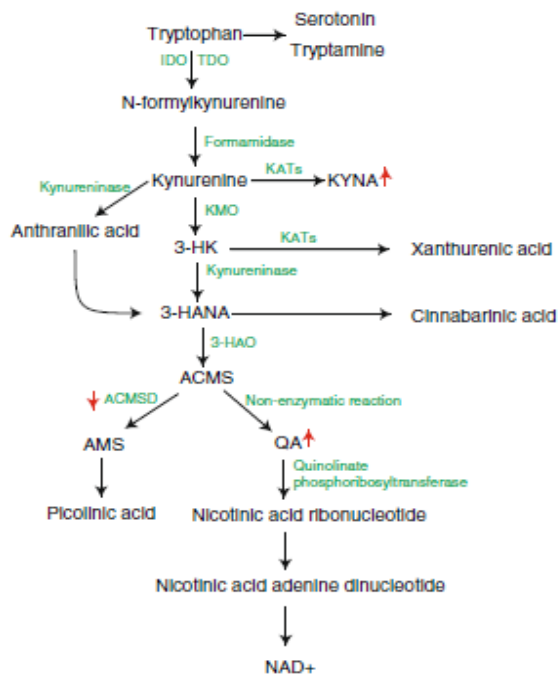
propósito para el que se han diseñado los estudios que se describen a continuación.

Con la perspectiva de casi 20 años, y considerando que un aspecto fundamental en los estudios epidemiológicos y genéticos de temblor esencial (TE) es la evaluación objetiva del temblor, consideramos que estos estudios deberían incluir algún tipo de marcador que permitiera mejorar las estimaciones. Las escalas de evaluación clínica son semicuantitativas y los sistemas de análisis electrofisiológico del temblor, disponible en los centros de atención terciaria, no son utilizables en los estudios de campo. Sin embargo, la evaluación cuantitativa del temblor basado en sensores de movimiento puede proporcionar información fiable y es capaz de evaluar con precisión la intensidad del temblor mientras se realizan un conjunto de tareas predefinidas (Mostile et al., 2012; Pulliam et al., 2014). Algunos sistemas portátiles y basados en esta tecnología ya se han validado, mediante su comparación con sistemas de rastreo electromagnético del movimiento (Dai et al., 2015), por lo que su incorporación, junto con las escalas clínicas, al screening de individuos con temblor en los estudios poblacionales mejoraría la sensibilidad del test.

En el trabajo número 2 (The *ACMSD* gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism), describimos la identificación de dos mutaciones (Trp26Stop y p. Ala920Thr) en los genes *ACMSD* y *MYBBP1A* respectivamente, que segregan con la enfermedad en una familia que presenta una clínica compatible con un temblor mioclónico cortical con epilepsia y parkinsonismo. Ambas mutaciones estaban ausentes en un gran número de ADNs de control, y sólo la mutación p.Trp26Stop en el gen *ACMSD*, que causa un stop prematuro en el codón y que está conservado entre otros ortólogos, fue predicha como patogénica por varios métodos computacionales. La asociación de la mutación *ACMSD* con la mioclónica cortical, epilepsia y parkinsonismo es muy interesante dado que *ACMSD* se expresa a un nivel bajo, pero significativo en el cerebro (Fukuoka et al., 2002). *ACMSD* es parte de la vía de la kinurenina, que es la vía principal del metabolismo del triptófano (figura 12). Muchas kinureninas, incluido el ácido quinolínico, cuyos niveles aumentan con el déficit de *ACMSD*, no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, o lo hacen de forma muy débil, por lo que debe de sintetizarse localmente en el cerebro (Stone et al., 2002), sugiriendo que la regulación del ácido quinolínico tiene lugar en el cerebro. Si bien no hemos podido examinar la actividad de *ACMSD* en nuestros pacientes, los niveles de expresión *ACMSD* han demostrado estar altamente correlacionados con los niveles de actividad de la enzima en estudios previos (Fukuoka et al., 2002), lo que sugiere que la mutación *ACMSD* identificada en nuestros pacientes, probablemente de como resultado una significativa disminución de su actividad enzimática. Además, se ha demostrado que la inhibición de *ACMSD* bloquea la conversión de triptófano en ácido picolínico, lo que resulta en la acumulación de ácido quinolínico celular (Fukuwatari et al.,

2004), y que la inyección intraventricular de ácido quinolínico es capaz de provocar actividad epiléptica en ratones (Lapin, 1978). Por esta razón, hipotetizamos que la mutación p.Trp26Stop en el gen ACMSD puede resultar en un aumento significativo de los niveles celulares de quinolínico en el cerebro, probablemente debido al déficit en su actividad enzimática, lo que llevaría al inicio y propagación de las crisis. Las crisis inducidas por ácido quinolínico se asociarían a niveles elevados de kinurenina extracelular, sugiriendo que los niveles de kinurenina se elevan en respuesta a la actividad epiléptica resultando de esta manera neuroprotectoras (Wu et al., 1996). Por otra parte, la participación de la transmisión anormal de la serotonina en la generación de crisis epilépticas y mioclonías ha sido discutida durante mucho tiempo. En particular, investigaciones preliminares han mostrado una reducción de triptófano y otros metabolitos de la serotonina en modelos animales y en pacientes con epilepsia mioclónica progresiva, así como en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con mioclonía cortical. Datos recientemente publicados también apoyan la implicación del metabolismo alterado del triptófano en la patogénesis de la enfermedad de Unverricht-Lundborg (Arbatova et al., 2005; Striano et al., 2010) y describen la utilización tanto del 5-hidroxi-L-triptófano como de alfa-lactoalbumina en el tratamiento de la epilepsia mioclónica (Errichiello et al., 2011; Pranzatelli et al., 1996)

Figura 12. Diagrama de la vía de quinurenina de la degradación del triptófano en los mamíferos

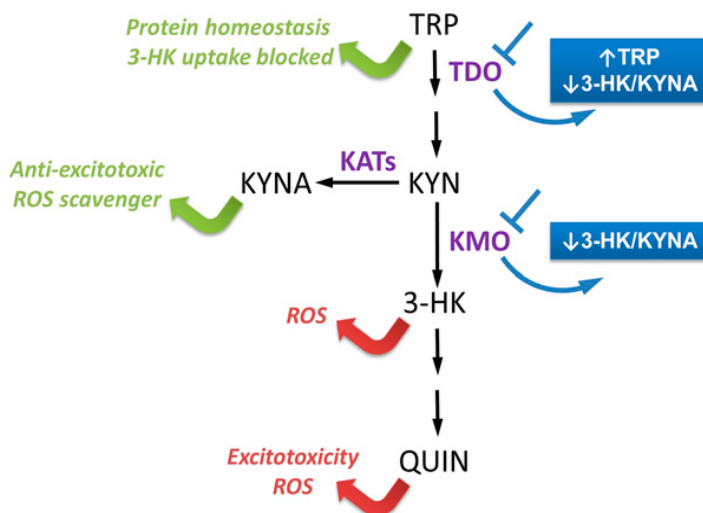


En rojo se resalta lo que se cree que se produce en presencia de una deficiencia de ACMSD.

IDO: indoleamine 2,3-dioxigenase; TDO: El triptófano 2,3-dioxigenasa; KYNA: ácido quinurénico; Kats: aminotransferasas quinurenina; 3-HK: 3-hidroxiquinurenina; 3-HANA: ácido 3-hidroxi-antranílico; 3- HAO: ácido 3-hidroxi-antranílico 3,4-dioxigenasa; ACMSD: α-amino-β-descarboxilasa carboxymuconate- ε-semialdehído; ACMS: a-amino-β-carboxymuconate-ε-semialdehído; AMS: alfa-aminomuconate-ε-semialdehído; GC: quinolínico ácido (quinolinato).

En conclusión, a pesar de son necesarios más estudios para poder dilucidar los mecanismos moleculares por los que la mutación en el gen *ACMSD* puede causar mioclonía cortical, epilepsia y parkinsonismo, concluimos que la mutación en el gen *ACMSD* que codifica una enzima crítica en la vía de la kirunenina del metabolismo del triptófano, es probablemente la responsable del fenotipo clínico en esta familia. Este hallazgo apoya la evidencia de que cambios celulares en el metabolismo de la kinurenina están implicados en la neurodegeneración (Schwarcz et al., 2012; Amaral et al., 2013) y sugiere que tanto la deficiencia cerebral de ácido kinurenico como la acumulación de ácido quinolínico pueden ser factores importantes en la patogénesis de temblor mioclónico familiar y epilepsia. Este trabajo no está acabado porque precisa de la confirmación bioquímica de la implicación de esta vía, la generación de un modelo animal y su posible modulación farmacológica. Por otro lado, abre una perspectiva del temblor como una entidad derivada de un tóxico endógeno que podría resolverse mediante algún tipo de intervención de carácter bioquímico (Vecsei et al., 2013). En este sentido, un trabajo recientemente publicado ha puesto de manifiesto el potencial terapéutico de la inhibición de dos enzimas críticas en la regulación de la vía como son la kynurenina-3-monooxigenasa (KMO) y la triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO). Las pruebas indican que la eficacia de la inhibición de KMO surge de la normalización del desequilibrio entre los metabolitos neurotóxicos (3-hidroxiquinurenina (3-HK) y el ácido quinolínico (QUIN)) y los neuroprotectores (ácido kinurénico (KYNA)). Los niveles aumentados de ácido kinurénico en relación con los de 3-hidroxiquinurenina son probablemente centrales para la protección conferida por la inhibición de TDO en un modelo de mosca de la fruta de la enfermedad de Huntington y que el tratamiento con triptófano reduce fuertemente la neurodegeneración desplazando el flujo en la vía hacia la síntesis de KYNA (Breda et al, 2016).

Figura 13. Consecuencias de la manipulación de la vía de Kinunerina (tomado de Breda et al, 2016)



Por su similitud con otras enfermedades de mecanismo etiopatológico similar, también se podrían considerar aproximaciones como la terapia de remplazo enzimático, que consiste en el aporte parenteral de la enzima deficiente (enzima recombinante humana) obtenida mediante ingeniería genética, u otro tipo de terapias como el uso de pequeñas moléculas (chaperonas farmacológicas) que acrecientan la actividad de la enzima residual natural y que han contribuido a cambiar el curso de algunas enfermedades como la enfermedad de Gaucher, Fabry, Pompe o las mucopolisacaridosis tipo I, II y VI.

En el trabajo número 3 (SORT1 Mutation Resulting in Sortilin Deficiency and p75NTR Upregulation in a Family With Essential Tremor), aportamos la identificación de una mutación en p.Gly171Ala del gen *SORT1*, que segrega con la enfermedad, en una pequeña familia con TE de inicio temprano, evolución clínica lentamente progresiva y respuesta al alcohol. La patogenicidad de la mutación *SORT1 p. G171A* se apoya en su ausencia en la población normal, su predicción como patogénica a través de varios programas computacionales, su alta conservación en otros ortólogos, su localización en un dominio funcionalmente relevante y el efecto que la disregulación de la sortilina tiene en el desarrollo de la neurodegeneración. En los estudios funcionales realizados observamos una reducción del RNAm y de la expresión de sortilina en las células portadoras de la mutación en comparación con las células control, sugiriendo que la mutación *SORT1 p.G171A* identificada en nuestros pacientes está implicada en la disregulación de sortilina. También observamos una expresión significativamente elevada del receptor de neurotrofina p75NTR (p75NTR) en células mutantes en comparación con las de tipo salvaje. Como se sabe que el receptor p75NTR se une a la proteína de la sortilina para mediar la muerte celular neuronal (Nykjaer et al., 2004) y modular la transmisión colinérgica (Yang et al., 2002), se puede considerar que en condiciones patológicas la disregulación de la sortilina puede incrementar los niveles de expresión del receptor p75NTR. Teniendo en cuenta que esta disregulación de p75NTR no sólo se da en condiciones de neurodegeneración (Nykjaer et al., 2005), sino también con el deterioro de la transmisión GABAérgica (Riffault et al., 2014), la deficiencia causada por la mutación *SORT1 p.G171A* en nuestra familia también podría ser la responsable de defectos en la neurotransmisión, lo que relacionaría la elevada expresión del receptor p75NTR con el desarrollo del temblor.

La sortilina es una de las principales proteínas neuronales de unión para la progranulina (PGRN) y una consecuencia de tal unión es la rápida endocitosis de la PGRN (Hu et al., 2010). Por esta razón, examinamos los niveles extracelulares de la PGRN en nuestro estudio, pero no observamos ninguna alteración en las células mutantes frente a las de tipo salvaje, ni en los portadores de la mutación frente a los no portadores. Dado que se ha descrito que mutaciones

SORT1 pueden distorsionar la endocitosis de PGRN sin alteración sus niveles (Nielsen et al., 2001; Hu et al., 2010), existe la posibilidad de que la mutación *SORT1* p.G171A pueda tener efecto sobre la endocitosis mediada por la sortilina, sin afectar sus niveles.

Por todo ello, hipotetizamos que el déficit de sortilina causado por la mutación p.Gly171Ala del gen *SORT1* puede dar lugar a defectos en la neurotransmisión y secundariamente el desarrollo de temblor en esta familia. Al igual que en el anterior, este trabajo abre la vía de investigación que pasaría por la recreación de la mutación en un modelo apropiado para el estudio del mecanismo fisiopatológico concreto y su modulación farmacológica.

En el trabajo número 4 (*SCN4A* pore mutation pathogenetically contributes to autosomal dominant essential tremor and may increase susceptibility to epilepsy), describimos los resultados de un WES realizado a una familia extensa con TE, en la que dos de los pacientes también presentaban epilepsia, y en la que se identificó una mutación (p. Gly1537Ser) en el gen *SCN4A* que se segregaba con la enfermedad. Con el fin de evaluar su patogenicidad se realizaron estudios de *screening* de genes candidatos, análisis de expresión en cerebros humanos y de ratón, así como estudios funcionales que demostraron que la mutación altera la selectividad en la conducción de iones facilitando la conductancia de los iones potasio y amonio, lo que podría contribuir al temblor y aumentar la susceptibilidad a la epilepsia, respectivamente.

Las mutaciones en el gen *SCN4A* habían sido descritas en una serie de enfermedades musculares, como las parálisis periódicas diskaliémicas, síndromes miasteniformes, y diferentes formas de miotonía y paramiotonía (Nicole, 2015), por lo que se pensaba que el canal Nav1.4 era un canal específicamente muscular. Sin embargo, nuestros resultados de análisis de expresión con RT-PCR confirmaron la existencia de altos niveles de RNAm en tejido cerebral lo que sugiere la existencia de una repercusión funcional del canal Nav1.4 en el cerebro. La contribución de un cambio en Nav1.4 a un fenotipo tremórico no debería ser una sorpresa considerando que mutaciones en otros canales del sodio de la familia Nav lo pueden producir; por ejemplo, el modelo de ratón con mutaciones en *SCN8A* no sólo manifiesta parálisis, distonía y debilidad muscular sino también un fenotipo temblor-ataxia (Meisler et al., 2001). Aunque algunas canalopatías producen un fenotipo relativamente uniforme, la variabilidad fenotípica del gen *SCN4A* es bien conocida, incluso en pacientes que portan la misma mutación, lo que sugiere que la expresión fenotípica asociada al gen *SCN4A* puede estar influenciada por otros factores genéticos o epigenéticos (Brunklaus et al., 2014; Lee et al., 2009). Esto puede explicar el por qué dos de nuestros portadores de la mutación *SCN4A*

desarrollaron también epilepsia. También hay que mencionar que se han descrito dos nuevas mutaciones *SCN4A* (P.Glu974Asp, p.Lys1126Ile) en un paciente con parálisis periódica normokaliémica que presentaba además movimientos involuntarios y epilepsia generalizada (Cao et al., 2014).

Los análisis funcionales de la mutación p.Gly1537Ser que se realizaron mediante estudios de conductividad a través de múltiples canales sobre toda la membrana celular de forma simultánea (*whole cell patch-clamp*), demostraron una tendencia a que se produjera, en los canales mutados, una activación y una inactivación significativamente más rápidas para potenciales cercanos al umbral. Esto provocaría una disminución de la amplitud de los potenciales de acción de las descargas repetitivas y facilitaría la aparición de las oscilaciones que están descritas en el temblor (Shaikh et al., 2008). En conjunto, estas alteraciones serían consecuencia de un cambio en la cinética del canal con una disminución en la selectividad del mismo lo que provocaría un aumento en la conductancia del potasio lo que a su vez provocaría un aumento en la amplitud de las oscilaciones producidas por debajo del umbral de excitación, así como un aumento de descargas repetitivas, provocando de esta manera un mecanismo de descarga oscilatorio (Amir et al., 2002). Además, nuestros resultados mostraron una conductividad significativamente elevada para el amonio sugiriendo un cambio de función. Este hallazgo no es inesperado, ya que estudios funcionales previos mostraron que una mutación de cisteína en el homólogo de rata de *G1537* (rata-G1530C) exhibía un aumento de la conductancia relativa de cationes, tales como litio, potasio y amonio (Chiamvimonvat et al., 1996). Tales cambios en la selectividad de iones son compatibles con su ubicación junto a un conocido residuo del filtro de selectividad, A1536 (Heinemann et al., 1992). La intoxicación con amonio o potasio es capaz de producir despolarización de neuronas GABAérgicas, lo que afectaría a la inhibición cortical produciendo de esta manera disfunción neurológica y actividad epiléptica (Ye et al., 1997; Rangroo-Thrane et al., 2013), lo que podría explicar la presencia de crisis en dos de los portadores de la mutación *SCN4A*. La participación del neurotransmisor inhibitorio GABA en la génesis del temblor está respaldada por la acción GABAérgica de algunos fármacos con propiedades antitremorícas, la constatación de niveles de GABA reducidos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con TE (Mally et al., 1996), las anomalías encontradas en la captación del receptor GABA A en las vías cerebelotalámicas en los estudios PET realizados en pacientes con TE, que sugieren una deficiencia primaria o una anomalía funcional de los mismos (Gironell et al., 2012; Boecker et al., 2010), y el hecho de que la deficiencia de las subunidades $\alpha 1$ del receptor GABA A es capaz de producir un fenotipo TE-like en ratones (Kralic et al., 2005).

La asociación de genes de los canales de sodio con múltiples fenotipos no es sorprendente debido a que son responsables de la generación y la orquestación de las señales

eléctricas que son de vital importancia para el funcionamiento de diferentes órganos, incluyendo el sistema nervioso, el corazón y el músculo. En este sentido, se ha descrito que dos polimorfismos de *SCN10A* están relacionados con defectos prominentes en la coordinación en pacientes con esclerosis múltiple, mediante su efecto en los circuitos cerebelo-talámicos (Roostaei et al., 2016).

En nuestro estudio, se presenta la primera familia con TE de herencia autosómica dominante debido a una mutación patógena en *SCN4A*. Aunque no podemos probar que la mutación *SCN4A* sea responsable de la epilepsia que presentan dos de los portadores de la mutación, dada la heterogeneidad fenotípica asociada a *SCN4A* y el papel ya conocido de la familia de los canales del sodio en los síndromes epilépticos, llegamos a la conclusión de que variabilidad genética en *SCN4A* puede conducir a un aumento en la susceptibilidad a las crisis epilépticas.

En conclusión, la patogenicidad de la mutación p.Gly1537Ser se apoya en su segregación con la enfermedad, su ausencia en individuos controles emparejados por etnicidad, su predicción como patógena por varios métodos computacionales, su localización en un dominio funcionalmente relevante, y su efecto sobre la conductividad y la selectividad iónicas. Por lo tanto, esta asociación entre la variabilidad genética de *SCN4A* con el desarrollo de temblor esencial, podrían incorporar a algunos casos de TE familiar a la creciente lista de canalopatías.

Los estudios realizados en las tres familias descritas han seguido una metodología similar. Las familias que participaron en el estudio fueron reclutadas de la base de datos de temblor esencial familiar de la Unidad de Trastornos del Movimiento del servicio de Neurología del Hospital Donostia. Se recogieron las historias clínicas de todos los posibles afectos y de los no afectos para construir un *pedrigree* detallado. Además de extracción de sangre para la obtención de ADN, se les realizó una evaluación clínica que constó de una serie de cuestionarios estructurados y una exploración neurológica y neuropsicológica y un estudio electrofisiológico. Mediante esta aproximación, se perseguía, por un lado, la confirmación del diagnóstico de temblor esencial en los miembros de la familia que lo presentaran y por otro lado la caracterización de su fenotipo, tanto en cuanto a las características del temblor como en cuanto la presencia o no de otros signos motores o síntomas no-motores.

El diagnóstico de seguridad de TE es un problema mayor que se ha puesto de manifiesto en muchos de los estudios de investigación en temblor esencial. Todos los estudios epidemiológicos, anatomopatológicos, clínicos-terapéuticos y genéticos dependen que este diagnóstico se haga de forma precisa evitando, por una parte, incluir la gran cantidad de entidades que pueden cursar como un temblor esencial en algún momento de su evolución y evitar por otra ser tan restrictivos con el diagnóstico que queden fuera de los grupos de estudio y análisis aquellos casos de temblor esencial que son clínicamente poco expresivos. En este sentido, se reconoce que los criterios diagnósticos que siguen vigentes en la actualidad (Deuschl et al., 1998) no son precisos y conllevan la inclusión de una serie de enfermedades heterogéneas bajo el término de TE. En este sentido, dos estudios mostraron que la tasa de diagnóstico erróneo de TE, puede llegar hasta el 37% y 50% respectivamente (Jain S et al., 2006; Schrag A, et al., 2000). Este problema puede constituir una de las limitaciones en este tipo de estudios y en concreto del nuestro. En nuestro caso, este problema ha sido afrontado mediante la utilización de criterios diagnósticos válidos y confiables. Los casos de TE debía cumplir los criterios diagnósticos habituales (Deuschl et al., 1998) así como aquellos diseñados específicamente para estudios genéticos en TE como los utilizados en el Washington Heights Inwood Genetic Study de TE (Louis, 1997). Todos los diagnósticos fueron realizados por un neurólogo senior y especializado en trastornos del movimiento y una posterior reevaluación de consenso entre el resto de los neurólogos del equipo tras una exhaustiva evaluación clínica y revisión de las pruebas complementarias realizadas (registros electrofisiológicos y las capturas de muestras de trazos, dibujos (espiral de Arquímedes) y escritura en una tableta electrónica.

Sin embargo, hay otros problemas diagnósticos muy importantes con los que nos hemos enfrentado en la evaluación de familias con TE y que constituyen una limitación para este tipo de estudios: (1) por un lado la edad de presentación del temblor en los diferentes individuos de la familia es variable (2) por otro la penetrancia de una hipotética mutación AD en una misma familia también es variable y (3) finalmente la observación de que algunos sujetos de estas familias presentan de forma muy prevalente otras enfermedades, como la ansiedad y depresión, que bien por si mismas o bien por los fármacos que precisan para su tratamiento pueden presentar un aumento del temblor fisiológico. Todo esto, en muchas ocasiones, dificulta el determinar si el temblor segrega o no con la mutación al no poder definir con absoluta seguridad si se trata de un verdadero TE o un temblor fisiológico exagerado. Abordar este problema ha motivado el inicio de una investigación paralela de análisis biométrico de los registros de escritura y dibujo recogidos en la tableta electrónica con objeto de diseñar una herramienta diagnóstica que permita una discriminación más precisa entre el temblor fisiológico y el TE. Este trabajo está actualmente en desarrollo (López de Ipiña et al., 2014).

Otra de las limitaciones del estudio es la posibilidad de existencia de fenocopias. De hecho, este problema se ha planteado en el estudio 4, donde uno de los miembros de la familia presentaba una epilepsia mioclónica juvenil no siendo portador de la mutación SCN4A. Esta observación es consistente con discusiones recientes llevadas a cabo sobre la arquitectura genética del TE donde la presencia de fenocopias ha sido señalada como un factor de confusión muy importante en la búsqueda de mutaciones en familias muy numerosas. Al mismo tiempo, el término 'fenocopias' también podría ser engañoso, ya que se reconoce que la tasa de diagnósticos erróneos es muy alta en el TE y que muchas de las familias estudiadas se caracterizan por una sobrerrepresentación de las personas afectadas. Todo ello plantea la cuestión de si se debe considerar un escenario más complejo de la participación genética en la patogénesis del TE incluyendo la herencia poligénica así como la epigenética (Ma et al., 2006; Testa, et al., 2013; Zimprich 2012).

Nuestra aproximación ha sido la de identificar genes que se correlacionan con un fenotipo determinado en familias que presentaban un temblor esencial partiendo de la hipótesis que dicho fenotipo podría ser consecuencia de una mutación única. En estudios de cohortes con base poblacional el WES ha demostrado su utilidad a la hora de evaluar fenotipos con amplia variabilidad fenotípica y la superposición de muchas causas genéticas potenciales (Johnson, 2015). La eficacia de las técnicas de secuenciación de nueva generación en el diagnóstico de enfermedades neurológicas varía entre cohortes clínicas y de investigación, pero en algunos estudios se acerca al 50% (Soden et al., 2012) por lo que el WES puede resultar una técnica eficaz desde el punto de vista coste-efectividad para el estudio de individuos en los que se sospecha una enfermedad genética. (Michelson et al., 2011). Por esta razón y a la vista de la homología en el fenotipo y la transmisión de la enfermedad a través de varias generaciones de estas familias, que orienta a un patrón de herencia autosómico dominante, hemos realizado la secuenciación del exoma en los miembros afectados de las familias suponiendo que la variante causante de la enfermedad se encontraba en la región codificante de proteínas, conscientes del hecho de que no puede excluirse la posibilidad de una mutación en una región reguladora que no podría ser capturada por esta tecnología.

La secuenciación del exoma (WES) es una técnica útil para secuenciar todos los genes codificantes de proteínas en el genoma. Consiste en seleccionar primero sólo el subconjunto de ADN que codifica las proteínas (exones), y luego la secuenciación este ADN utilizando cualquier tecnología de secuenciación de alto rendimiento. Hay unos 180.000 exones, que constituyen aproximadamente el 1% del genoma humano, o aproximadamente 30 millones de pares de bases, y se estima que las mutaciones en estas secuencias es más probable que sean patogénicas que en el restante 99%. Un 84% de los genes humanos se expresan en el

cerebro (Hawrylycz et al., 2012) por lo que no es sorprendente que los neurólogos hayamos adoptado rápidamente estas nuevas modalidades de análisis genético. El impacto de las técnicas de secuenciación de nueva generación es doble. En primer lugar, se han descubierto nuevos genes como causa de enfermedades neurológicas (Martikainen et al., 2015), en segundo lugar, y más común, se han podido relacionar nuevos fenotipos con genes previamente descritos (Schottman et al., 2015; Shieh C et al., 2015). Sin embargo, el WES sólo es capaz de identificar a aquellas variantes que se encuentran en la región codificante de los genes afectan a la función de la proteína. No es capaz de identificar variantes estructurales y no codificantes asociadas con la enfermedad que podrían ser identificadas utilizando otros métodos como el GWAS. Aunque este método sería la aproximación estándar para conseguir una mejor comprensión de las variantes genéticas de poblaciones, en la realidad no es práctica debido a los altos costes y consumo de tiempo asociado con la secuenciación de un gran número de genomas (Ng, 2009). A la hora de trasladar las variantes raras identificadas a la clínica, el tamaño de la muestra y la capacidad de interpretar los resultados indican que, con nuestros conocimientos actuales en genética, la secuenciación del exoma puede ser la herramienta más útil (Choi, 2009).

El análisis estadístico de la gran cantidad de datos derivados de las secuenciaciones es otro de los retos. La gran cantidad de resultados falsos positivos y falsos negativos que se producen con frecuencia, han obligado a desarrollar estrategias para mejorar este problema, como son el comparar las variantes genéticas identificadas entre la secuenciación y el genotipado basado en arrays o comparar los SNPs con los resultados de la secuenciación *Sanger* de individuos presentes en bases de datos públicas (Ng, 2009). Este sistema de filtrado de variantes genéticas comunes se basa en bases de datos (dbSNP) que podrían no tener información precisa sobre una variación de alelos determinada por lo que el uso de listas de variaciones comunes de un WES sería más fiable. Un problema de este enfoque es que a medida que el número de exomas secuenciados aumenta, también aumentará el número de variantes poco comunes, por lo que será necesario desarrollar umbrales para definir adecuadamente aquellas variantes comunes que son poco probables que se asocien con un fenotipo de la enfermedad (Biesecker, 2010). La heterogeneidad genética y la etnicidad son también importantes limitaciones porque pueden aumentar el número de hallazgos falsos positivos o falsos negativos lo que puede hacer la identificación de los genes candidatos más difícil. Nosotros hemos utilizado una aproximación similar a la del *genotype-first* (primero el genotipado) (Stessman et al., 2014) que podría ayudar a superar estas limitaciones. Con esta aproximación se realiza el estudio considerando la existencia de un genotipo común basado en los test moleculares previamente a su clasificación fenotípica. Por lo tanto, este enfoque puede

prevenir la existencia de un sesgo fenotípico inicial y permitir la identificación de genes que representan una contribución significativa a la etiología de la enfermedad, al no afectarse por la heterogeneidad fenotípica, la penetrancia incompleta y los niveles de expresividad.

El proceso de identificación de mutaciones existentes en una familia y el aceptar a alguna de ellas como la causante del fenotipo en cuestión es la segunda parte del trabajo y es digna de mención. El creciente uso de la tecnología de secuenciación masiva ha identificado una gran cantidad de variantes en el genoma. Cualquier variante rara tiene la capacidad potencial de ser patógena incluso si las herramientas bioinformáticas predicen su benignidad, del mismo modo que variantes teóricamente patógenas han demostrado ser benignas en estudios posteriores. Muchas de estas variantes resultarán ser benignas por lo que los resultados de estos estudios deben considerarse con cautela. De hecho, uno de los hallazgos más importantes del *Exoma Aggregation Consortium* (ExAC), el mayor catálogo de variaciones genéticas en las regiones codificadoras de proteínas del genoma humano, es que muchas mutaciones genéticas han sido mal clasificadas como nocivas (Lek et al., 2016). Los autores de ese estudio estiman que cada persona tiene en su genoma un promedio de 54 mutaciones que actualmente se consideran patógenas, pero alrededor de 41 de estas ocurren con tanta frecuencia en la población que no es de hecho probable que causen una enfermedad grave. Esto plantea dos desafíos para los investigadores: por una parte, cómo discriminar aquellas mutaciones que son consideradas patógenas y que son realmente benignas y por otra, cómo aplicar pruebas más rigurosas para poder encontrar las causas genéticas de la enfermedad. Para reevaluar los vínculos entre las enfermedades y las mutaciones, los investigadores deben tener acceso a un grupo de personas cuya información genética y clínica detallada se conozca, por lo que esperamos que los proyectos existentes para vincular genomas de la gente a sus registros de salud detallados, como la Iniciativa de Medicina de Precisión, que pretende secuenciar al menos a 1 millón de estadounidenses y el Proyecto 100.000 Genomas del Reino Unido, sean de ayuda.

Pero además de compararlos con las bases de datos existentes y enriquecer estas de forma progresiva, se necesitan estudios funcionales para evaluar la patogenicidad de las variantes identificadas en estos genes candidatos, tal y como se ha realizado en algunos estudios que han conseguido identificar mutaciones en genes relacionados con el TE (Hor et al., 2015). Esta fue la metodología utilizada en el cuarto estudio que presentamos en el que se identificó una mutación (p. Gly1537Ser) que segregaba con la enfermedad en el gen *SCN4A* y con el fin de evaluar su patogenicidad se realizaron estudios de *screening* de genes

candidatos, análisis de expresión en cerebros humanos y de ratón y estudios funcionales que demostraron que la mutación altera la selectividad en la conducción de iones facilitando la conductancia de los iones potasio y amonio, lo que podría contribuir al temblor y aumentar la susceptibilidad a la epilepsia, respectivamente. En los otros dos estudios la metodología utilizada no fue tan exhaustiva. Sin embargo, tal y como se ha discutido previamente y a pesar de que son necesarios estudios funcionales para dilucidar los mecanismos moleculares por los que las mutaciones *ACMSD* y *SORT1* son capaces de causar los síntomas en nuestros pacientes, estas mutaciones junto con los datos indirectos relacionados con su función sugieren que estas variantes son las responsables del fenotipo de nuestros pacientes en ambas familias. En el segundo estudio descrito, se identificaron dos mutaciones que segregaban con la clínica, pero sólo la mutación p.Trp26 en el gen *ACMSD*, que condiciona un stop prematuro del codón y que está conservado en otros ortólogos, resulta predictiva de ser patogénica. Este hallazgo, junto con estudios previos soportan la evidencia de que cambios celulares en los metabolitos de la vía de la kinurenina están implicadas en neurodegeneración (Schwarcz et al., 2012; Amaral et al., 2013) y sugiere que la deficiencia de ácido kinurénico y la acumulación de ácido quinolínico que se produce de forma específica en el cerebro pueden ser factores importantes en la patogénesis de temblor mioclónico cortical y la epilepsia. En el tercer estudio, la patogenicidad de la mutación p.G171A del gen *SORT1* se sustenta en su ausencia en la población normal, su predicción como patogénica por diferentes programas computacionales, su conservación en otros ortólogos, su localización en un dominio funcionalmente relevante y su efecto en la regulación de la sortilina. En este caso también son necesarios estudios funcionales que lo confirmen, pero dado el papel de la sortilina en la regulación la neurodegeneración (Harrington et al., 2004; Jansen et al., 2007; Willnow et al., 2008) y tomando en cuenta que los cambios en sus niveles de expresión se correlacionan con cambios funcionales en la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica cerebral (Blaesse et al., 2009), estamos en disposición de hipotetizar que el déficit de sortilina causada por la mutación *SORT1-p.G171A* puede producir déficits en la neurotransmisión que finalmente sean los causantes del temblor.

A pesar de la alta prevalencia del TE y a que el papel de cerebelo es comúnmente aceptado como pieza central en su fisiopatología, la naturaleza exacta de las anomalías cerebelosas existentes en los pacientes con TE todavía se conocen mal y actualmente hay un intenso debate sobre si se trata de una enfermedad funcional o de etiología neurodegenerativa (Deuschl et al., 2009; Louis 2015). En este trabajo, hemos identificados la existencia de mutaciones en dos genes en dos familias independientes con TE. La mutación en el gen *SORT1* podría ser patógeno en la medida que la desregulación de la sortilina participa en el

crecimiento, la diferenciación, plasticidad y supervivencia neuronal lo que podría indicar un mecanismo patogénico de características neurodegenerativas, aunque hay que señalar que este punto es una hipótesis y existen otras explicaciones posibles como son su papel en el sistema de tráfico transmembrana, o en el sistema de transporte mediado por vesículas. Sin embargo, la mutación descrita en *SCN4A* orientaría a la existencia de casos de TE secundarios a la disfunción de la conducción de iones en el canal del sodio sugiriendo un trastorno funcional más que neurodegenerativo en estos casos.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La prevalencia del temblor esencial ajustada por edad en la población de edad de 65 años o mayor de la comarca del Bidasoa (Guipúzcoa) es del 4.8%. La prevalencia aumenta de forma significativa con la edad y no hay diferencias en relación al sexo. Estos resultados son similares a los descritos en otros estudios con un diseño similar lo que sugiere una baja variabilidad geográfica en la prevalencia del TE.
2. La mutación p.Trp26Stop en el gen *ACMSD* segrega con la enfermedad en una familia con temblor mioclónico cortical, epilepsia y parkinsonismo y es responsable del fenotipo de estos pacientes. Este hallazgo apunta a que cambios intracelulares de los metabolitos en la vía de la kinurenina estarían implicados en la neurodegeneración y sugieren que tanto el déficit de ácido kinurénico, así como la acumulación de ácido quinolínico pueden ser factores importantes en la patogénesis del temblor mioclónico cortical y epilepsia. De esta manera, la vía de la kinurenina podría resultar una potencial diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.
3. La mutación p.Gly171Ala en el gen *SORT1* segrega con la enfermedad en una familia de temblor esencial de inicio temprano y herencia dominante. Esta mutación, además de afectar a la expresión de su proteína codificante, sortilina, también afecta a los niveles de RNAm de su receptor, neurotrofina p75, que se conoce que está implicado en el daño cerebral, apoptosis y neurotransmisión GABAérgica inhibitoria en el SNC, por lo que podemos hipotetizar que *SORT1* está implicado en defectos en la neurotransmisión que finalmente conducen al desarrollo del temblor.
4. La mutación p.Gly1537Ser en el gen *SCN4A* segrega con la enfermedad en una familia con temblor esencial en la que dos de los pacientes también desarrollan epilepsia. Los estudios funcionales realizados demuestran una alteración en la cinética y en selectividad de la conducción de iones en el canal del sodio, facilitando la conductancia tanto del potasio como del amonio lo que podría contribuir al desarrollo del temblor y la epilepsia respectivamente. En este estudio hemos reportado, por primera vez, la variabilidad genética en *SCN4A* con el desarrollo de temblor esencial, lo que permite incluir al menos a algún tipo de temblor esencial a la ya extensa lista de canalopatías implicadas en trastornos neurológicos.

5. La variabilidad fenotípica y genética observada en las familias estudiadas apoya la hipótesis que el temblor esencial, simple o complejo, al menos tal y como lo entendemos hoy día, constituye “una familia” de enfermedades más que una entidad única y que en su fisiopatología pueden estar implicados múltiples mecanismos tanto neurodegenerativos.
6. Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) y concretamente la secuenciación del exoma (WES) han demostrado una gran eficacia en el estudio de las correlaciones fenotipo-genotipo en familias concretas con presencia de varios miembros afectados y un patrón de segregación más o menos definido. Sin embargo, su rendimiento baja en los casos individuales consecuencia del gran número de variantes detectadas.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFIA

- Abbruzzese G, Pigullo S, Di Maria E, et al. Clinical and genetic study of essential tremor in the Italian population. *Neurol Sci* 2001;22(1):39-40.
- Acar G, Acar F, Bir LS, Kizilay Z, Cirak B. Vim stimulation in Holmes' tremor secondary to subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 2010;32(9):992-4.
- Adler CH, Shill HA, Beach TG. Essential tremor and Parkinson's disease: lack of a link. *Mov Disord*. 2011 Feb 15;26(3):372-7.
- Adler CH, Hentz JG, Shill HS, Sabbagh MN, Driver-Dunckley E, Evidente VE, et al. Probable RBD is increased in Parkinson's disease but not in essential tremor or restless legs syndrome. *Park. Relat. Disord.*, 17 (2011b), pp. 456–458
- Aharon-Peretz J, Badarny S, Ibrahim R, Gershoni-Baruch R, Hassoun G. Essential tremor prevalence is low in the Druze population in Northern Israel. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 2012;2.
- Albanese A, Sorbo FD. Dystonia and Tremor: The Clinical Syndromes with Isolated Tremor. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2016 Apr 5;6:319.
- Alusi SH, Aziz TZ, Glickman S, Jahanshahi M, Stein JF, Bain PG. Stereotactic lesional surgery for the treatment of tremor in multiple sclerosis: a prospective case-controlled study. *Brain* 2001;124 (Pt 8):1576-89
- Amaral M, Outeiro TF, Scrutton NS, Giorgini F. The causative role and therapeutic potential of the kynurenine pathway in neurodegenerative disease. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91:705–713
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV*. American Psychiatric Association, USA. 1994
- Amir, R., Liu, C.N., Kocsis, J.D. and Devor, M. (2002) Oscillatory mechanism in primary sensory neurones. *Brain*, 125, 421-435.
- Antonini A, Berto P, Lopatriello S, Tamma F, Annemans L, Chambers M. Cost-effectiveness of 123I-FP-CIT SPECT in the differential diagnosis of essential tremor and Parkinson's disease in Italy. *Mov Disord* 2008;23(15):2202-9.
- Applegate LM, Louis ED. Essential tremor: mild olfactory dysfunction in a cerebellar disorder. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11(6):399-402.
- Arbatova J, D'Amato E, Vaarmann A, Zharkovsky A, Reeben M. Reduced serotonin and 3-hydroxyanthranilic acid levels in serum of cystatin B-deficient mice, a model system for progressive myoclonus epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46(Suppl 5):49–51
- Aridon P, Ragonese P, De Fusco M, Salemi G, Casari G, Savettieri G. Further evidence of genetic heterogeneity in familial essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14(1):15-8.

- Ayache SS, Al-Ani T, Lefaucheur JP. Distinction between essential and physiological tremor using Hilbert-Huang transform. *Neurophysiol Clin* 2014;44(2):203-12.
- Ayuso P, Agúndez JA, Alonso-Navarro H, Martínez C, Benito-León J, Ortega-Cubero S, Lorenzo-Betancor O, Pastor P, López-Alburquerque T, García-Martín E, Jiménez-Jiménez FJ. Heme Oxygenase 1 and 2 Common Genetic Variants and Risk for Essential Tremor. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jun;94(24):e968.
- Babij R, Lee M, Cortes E, Vonsattel JP, Faust PL, Louis ED. Purkinje cell axonal anatomy: quantifying morphometric changes in essential tremor versus control brains. *Brain* 2013;136(Pt 10):3051-61.
- Bain PG, Findley LJ, Atchison P, Behari M, Vidailhet M, Gresty M, Rothwell JC, Thompson PD, Marsden CD. Assessing tremor severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993 Aug;56(8):868-73.
- Bain PG, Findley LJ, Thompson PD, et al. A study of hereditary essential tremor. *Brain* 1994;117(Pt 4):805-24.
- Bain PG, Findley LJ, Britton TC, et al. Primary writing tremor. *Brain* 1995; 116:203-9
- Bain P, Brin M, Deuschl G, et al. Criteria for the diagnosis of essential tremor. *Neurology*. 2000;54(11 Suppl 4): S7.
- Bain PG. Dystonic tremor presenting as parkinsonism: long-term follow-up of SWEDDs. *Neurology* 2009;72(16):1443-5.
- Baizabal-Carvallo JF, Stocco A, Muscal E, Jankovic J. The spectrum of movement disorders in children with anti-NMDA receptor encephalitis. *Mov Disord* 2013;28(4):543-7.
- Baizabal-Carvallo JF, Cardoso F, Jankovic J. Myorhythmia: phenomenology, etiology, and treatment. *Mov Disord*. 2015 Feb;30(2):171-9
- Balaban H, Altuntas EE, Uysal IO, Senturk IA, Topaktas S. Audio-vestibular evaluation in patients with essential tremor. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269(6):1577-81.
- Barbanti P, Fabbrini G, Aurilia C, Defazio G, Colosimo C, Berardelli A. No association between essential tremor and migraine: a case-control study. *Cephalalgia* 2010;30(6):686-9.
- Barut BO, Tascilar N, Varo A. Sleep disturbances in essential tremor and parkinson disease: a poly-somnographic study. *J. Clin. Sleep. Med*. 2015; 11:655–662
- Benito-Leon J, Bermejo-Pareja F, Louis ED; Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. Incidence of essential tremor in three elderly populations of central Spain. *Neurology* 2005;64(10):1721-5.
- Benito-Leon J, Louis ED, Bermejo-Pareja F. Elderly-onset essential tremor is associated with dementia. *Neurology*. 2006b May 23;66(10):1500–1505.
- Benito-León J, Louis ED, Bermejo-Pareja F; Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. Population-based case-control study of cigarette smoking and essential tremor. *Mov Disord*. 2008 Jan 30;23(2):246-52.

- Benito-Leon J, Louis ED, Bermejo-Pareja F. Short sleep duration heralds essential tremor: a prospective, populationbased study. *Mov Disord* 2013;28(12):1700-7.
- Benito-Leon J, Louis ED, Sanchez-Ferro A, Bermejo-Pareja F. Rate of cognitive decline during the premotor phase of essential tremor: a prospective study. *Neurology* 2013b;81: 60–66.
- Benito-León J, Labiano-Fontcuberta. Linking Essential Tremor to the Cerebellum: Clinical Evidence. *Cerebel-lum*. 2015 Oct 31. [Epub ahead of print]
- Bermejo-Pareja F, Louis ED, Benito-León J; Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. Risk of incident dementia in essential tremor: a population-based study. *Mov Disord*. 2007 Aug 15;22(11):1573-80.
- Berry-Kravis E, Lewin F, Wu J, et al. Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study. *Ann Neurol* 2003;53(5):616-23.
- Bhalsing KS, Saini J, Pal PK. Understanding the pathophysiology of essential tremor through advanced neuroimaging: a review. *J Neurol Sci* 2013;335(1-2):9-13
- Biesecker LG (Jan 2010). "Exome sequencing makes medical genomics a reality". *Nat. Genet.* 42 (1): 13–14. doi:10.1038/ng0110-13
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*. 2009 Mar 26;61(6):820-38.
- Boecker H, Brooks DJ. Functional imaging of tremor. *Mov Disord* 1998;13(Suppl 3):64-72.
- Boecker H, Weindl A, Brooks DJ, et al. GABAergic dysfunction in essential tremor: an 11C-flumazenil PET study. *J Nucl Med* 2010;51(7):1030-5.
- Bonuccelli U. Essential tremor is a neurodegenerative disease. *J Neural Transm* 2012;119 (11):1383-7; discussion 1373.
- Bourdain F, Apartis E, Trocello J-M, Vidal J-S, Masnou P, Vercueil L, et al. Clinical analysis in familial corti-cal myoclonic tremor allows differential diagnosis with essential tremor. *Mov Disord*. 2006 May;21(5):599–608.
- Breda C, Sathyaikumar KV, Sograte Idrissi S, Notarangelo FM, Estranero JG, Moore GG, Green EW, Kyriacou CP, Schwarcz R, Giorgini F. Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 10;113(19):5435-40.
- Brin MF, Koller W. Epidemiology and genetics of essential tremor. *Mov Disord* 1998;13 Suppl 3:55-63
- Brittain JS, Brown P. The many roads to tremor. *Exp Neurol* 2013; 250:104-7
- Broersma M, van der Stouwe AM, Buijink AW, de Jong BM, Groot PF, Speelman JD, Tijssen MA, van Rootselaar AF, Maurits NM. Bilateral cerebellar activation in unilaterally challenged essential tremor. *Neuroimage Clin*. 2015 Dec 28; 11:1-9.
- Brooks DJ, Playford ED, Ibanez V, et al. Isolated tremor and disruption of the nigrostriatal dopaminergic system: an 18F-dopa PET study. *Neurology* 1992;42(8):1554-60.

- Brown P, Thompson PD. Electrophysiological aids to the diagnosis of psychogenic jerks, spasms, and tremor. *Mov Disord* 2001;16(4):595-9.
- Brunklaus, A., Ellis, R., Reavey, E., Semsarian, C. and Zuberi, S.M. (2014). Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *J.Med. Genet.*, 51, 650-658
- Buijink AW, Caan MW, Tijssen MA, Hoogduin JM, Maurits NM, van Rootselaar AF. Decreased cerebellar fiber density in cortical myoclonic tremor but not in essential tremor. *Cerebellum* 2013;12(2):199-204
- Buijink AW, Caan MW, Contarino MF, et al. Structural changes in cerebellar outflow tracts after thalamotomy in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(5):554-7.
- Buijink AW, Broersma M, van der Stouwe AM, Sharifi S, Tijssen MA, Speelman JD, Maurits NM, van Rootselaar AF. Cerebellar Atrophy in Cortical Myoclonic Tremor and Not in Hereditary Essential Tremor—a Voxel-Based Morphometry Study. *Cerebellum*. 2015 Oct 30.
- Busenbark K, Barnes P, Lyons K, Ince D, Villagra F, Koller WC. Accuracy of reported family histories of essential tremor. *Neurology* 1996; 47:264-5.
- Buysse, D.J., Reynolds, C.F. III, Monk, T.H., Berman, S.R. Kupfer, D.J. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* 1989; 28: 193–213.
- Cao L, Li X, Hong D. Normokalemic periodic paralysis with involuntary movements and generalized epilepsy associated with two novel mutations in SCN4A gene. *Seizure* 2014; 24:134–136.
- Carlo A S, Gustafsen C, Mastrobuoni G, Nielsen M S, Burgert T, Hartl D, et al. The proneurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid-beta peptide in the brain. *Journal of Neuroscience* 2013; 33: 358–370.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev* 2005; 57: 397–409.
- Ceravolo R, Antonini A, Volterrani D, et al. Predictive value of nigrostriatal dysfunction in isolated tremor: a clinical and SPECT study. *Mov Disord* 2008;23(14):2049-54.
- Chandran V, Pal PK, Reddy JY, Thennarasu K, Yadav R, Shivashankar N. Non-motor features in essential tremor. *Acta Neurol Scand* 2012;125(5):332-7.
- Chandran V, Pal PK. Essential tremor: beyond the motor features. *Parkinsonism Relat Disord* 2012b;18(5):407-413.
- Chao YX, Lin Ng EY, Tio M, Kumar P, Tan L, Au WL, Yih Y, Tan EK. Essential tremor linked TENM4 mutation found in healthy Chinese individuals. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Oct;31:139-140
- Chatterjee A, Jurewicz EC, Applegate LM, Louis ED. Personality in essential tremor: further evidence of non-motor manifestations of the disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Jul;75(7):958-61.

- Chaudhuri KR, Buxton-Thomas M, Dhawan V, Peng R, Meilak C, Brooks DJ. Long duration asymmetrical postural tremor is likely to predict development of Parkinson's disease and not essential tremor: clinical follow up study of 13 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(1):115-7.
- Chen H, Song Z, Yuan L, Xiong W, Yang Z, Gong L, Deng H. Genetic analysis of PITX3 variants in patients with essential tremor. *Acta Neurol Scand*. 2016 May 4. doi: 10.1111/ane.12608. [Epub ahead of print]
- Chen Z Y, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng C X, Herrera DG, et al. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *Journal of Neuroscience* 2005; 25: 6156–6166.
- Chen J, Yao J, Chen L, Miao H, Mao C, Liu C. Sleep disorders associated with essential tremor and Parkinson's disease. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2015; 95: 205–209.
- Chiamvimonvat, N., Perez-Garcia, M.T., Ranjan, R., Marban, E. and Tomaselli, G.F. Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na⁺ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron* 1996; 16:1037–1047.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 10;106(45):19096-101.
- Cinar N, Sahin S, Okluoglu Onay T, Karsidag S. Balance in essential tremor during tandem gait: is the first mis-step an important finding. *J Clin Neurosci* 2013;20(10):1433-7.
- Clark LN, Liu X, Parmalee NL, Hernandez N, Louis ED. The microtubule associated protein tau H1 haplotype and risk of essential tremor. *Eur J Neurol* 2014;21(7):1044-8.
- Clark LN, Ye X, Liu X, Mirzozoda K, Louis ED. Genetic analysis of ten common degenerative hereditary ataxia loci in patients with essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Aug;21(8):943-7
- Cohen O, Pullman S, Jurewicz E, Watner D, Louis ED. Rest tremor in patients with essential tremor: prevalence, clinical correlates, and electrophysiologic characteristics. *Arch Neurol* 2003;60(3):405-10.
- Contarino M.F., Groot P.F., van der Meer J.N., Bour L.J., Speelman J.D., Nederveen A.J., van den Munck-hof P., Tijssen M.A., Schuurman P.R., van Rootselaar A.F. Is there a role for combined EMG-fMRI in exploring the pathophysiology of essential tremor and improving functional neurosurgery? *PLoS One*. 2012;7(10):e46234.
- Conte A, Ferrazzano G, Manzo N, Leodori G, Fabbrini G, Fasano A, Tinazzi M, Berardelli A. Somatosensory temporal discrimination in essential tremor and isolated head and voice tremors. *Mov Disord*. 2015 May;30(6):822-7.
- Conway D, Bain PG, Warner TT, Davis MD, Findley LJ, Thompson PD, et al. Linkage analysis with chromosome 9 markers in hereditary essential tremor. *Mov Disord* 1993; 8:374-6.
- Cortese R, Hartmann O, Berlin K, Eckhardt F. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer.

International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2008; 40:1494–1508.

- Dai H, Zhang P, Lueth TC. Quantitative Assessment of Parkinsonian Tremor Based on an Inertial Measurement Unit. *Sensors (Basel)*. 2015 Sep 29;15(10):25055-71
- Defazio G, Conte A, Gigante AF, Fabbrini G, Berardelli A. Is tremor in dystonia a phenotypic feature of dystonia? *Neurology*. 2015 Mar 10;84(10):1053-9.
- De Fusco M, Vago R, Striano P, Di Bonaventura C, Zara F, Mei D, Kim MS, Muallem S, Chen Y, Wang Q, Guerrini R, Casari G. The α 2B-adrenergic receptor is mutant in cortical myoclonus and epilepsy. *Ann Neurol*. 2014 Jan;75(1):77-87
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Daly, M. J. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*. 2011;43: 491–498.
- Delay C, Tremblay C, Brochu E, et al. Increased LINGO1 in the cerebellum of essential tremor patients. *Mov Disord*. 2014 Nov;29(13):1637-47
- Deng H, Le WD, Guo Y, Huang MS, Xie WJ, Jankovic J. Extended study of A265G variant of HS1BP3 in essential tremor and Parkinson disease. *Neurology* 2005;65(4):651-2.
- Deng H, Le W, Davidson AL, Xie W, Jankovic J. The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations in patients with essential tremor. *Neurosci Lett* 2006; 407:97-100.
- Deng H, Xie WJ, Le WD, Huang MS, Jankovic J. Genetic analysis of the GABRA1 gene in patients with essential tremor. *Neurosci Lett* 2006; 401: 16-9.
- Deng H, Le W, Jankovic J. Genetics of essential tremor. *Brain*. 2007 Jun;130(Pt 6):1456–1464.
- Deng H, Gu S, Jankovic J. LINGO1 variants in essential tremor and Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2012;125(1):1-7.
- Depienne C, Magnin E, Bouteiller D, Stevanin G, Saint-Martin C, Vidailhet M, Apartis E, Hirsch E, LeGuern E, Labauge P, Rumbach L. Familial cortical myoclonic tremor with epilepsy: the third locus (FCMTE3) maps to 5p. *Neurology*. 2010 Jun 15;74(24):2000-3
- Deuschl G, Heinen F, Kleedorfer B, Wagner M, Lüicking CH, Poewe W. Clinical and polymyographic investigation of spasmodic torticollis. *J Neurol* 1992;239(1):9-15.
- Deuschl G, Toro C, Valls-Sole J, et al. Symptomatic and essential palatal tremor. Clinical, physiologic and MRI analysis. *Brain* 1994; 117:775-88.
- Deuschl G, Bain P, Brin M. Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. *Mov Disord* 1998a;13(Suppl 3):2-23.
- Deuschl G, Köster B, Lüicking CH, Scheidt C. Diagnostic and pathophysiological aspects of psychogenic tremors. *Mov Disord* 1998b;13(2):294-302.
- Deuschl G, Eible R. Essential Tremor – Neurodegenerative or Nondegenerative Disease: Towards a Working Definition of ET. *Movement Disorders* 2009; 24(14): 2033–2041.
- Deuschl G, Wenzelburger R, Loffler K, Raethjen J, Stolze H. Essential tremor and cerebellar

- dysfunction clinical and kinematic analysis of intention tremor. *Brain* 2000;123(Pt 8):1568-80.
- Deuschl G, Petersen I, Lorenz D, Christensen K. Tremor in the elderly: essential and aging-related tremor. *Mov Disord* 2015; 30(10):1327-1334.
 - Dideriksen JL, Gallego JA, Holobar A, Rocon E, Pons JL, Farina D. One central oscillatory drive is compatible with experimental motor unit behaviour in essential and Parkinsonian tremor. *J Neural Eng.* 2015 Aug;12(4):046019. doi: 10.1088/1741-2560/12/4/046019.
 - DiDio AS, Koller WC. 2005. The History of Essential Tremor. En, Lyon KR, Pahwa R (Eds). *Handbook of Essential Tremor and other Tremor Disorders*. Pp 3-11. Taylor and Francis Group. Florida
 - Djaldetti R, Nageris BI, Lorberboym M, Treves TA, Melamed E, Yaniv E. [(123)I]-FP-CIT SPECT and olfaction test in patients with combined postural and rest tremor. *J Neural Transm* 2008;115(3):469-72.
 - Dogu O, Sevim S, Camdeviren H, et al. Prevalence of essential tremor: door-to-door neurologic exams in Mersin Province, Turkey. *Neurology*. 2003;61(12):1804–1806.
 - Dogu O, Louis ED, Sevim S, Kaleagasi H, Aral M. Clinical characteristics of essential tremor in Mersin, Tur-key--a population-based door-to-door study. *J Neurol* 2005;252(5):570-4.
 - Dogu O, Louis ED, Tamer L, Unal O, Yilmaz A, Kaleagasi H. Elevated blood lead concentrations in essential tremor: a case-control study in Mersin, Turkey. *Environ Health Perspect* 2007;115(11):1564-8
 - Dupuis MJ, Evrard FL, Jacquerye PG, Picard GR, Lermen OG. Disappearance of essential tremor after stroke. *Mov Disord* 2010;25(16):2884-7.
 - Elbe RJ. Peripheral neuropathies and tremor. *Neurology* 1983; 33:1389.
 - Elble, R.J., Sinha, R. and Higgins, C. Quantification of tremor with a digitizing tablet. *J. Neurosci. Methods*. 1990; 32:193–198
 - Elble RJ. The role of aging in the clinical expression of essential tremor. *Exp Gerontol* 1995;30(3-4):337-47.
 - Elble RJ, Brilliant M, Leffler K, Higgins C. Quantification of essential tremor in writing and drawing. *Mov Disord* 1996;11(1):70-8.
 - Elble RJ. Tremor in ostensibly normal elderly people. *Mov Disord* 1998;13(3):457-64.
 - Elble RJ. Diagnostic criteria for essential tremor and differential diagnosis. *Neurology* 2000a; 54(11): S2-S6
 - Elble RJ. Essential tremor frequency decreases with time. *Neurology* 2000b;55(10):1547-51.
 - Elble RJ. Physiologic and enhanced physiologic tremor. In: Hallett M, editor. *Handbook of Clinical Neurophysiology*. New York: Elsevier Science B. V. 2003, 357-64.
 - Elble RJ. Gravitational artifact in accelerometric measurements of tremor. *Clin Neurophysiol* 2005;116(7):1638-43.

- Elble RJ, Pullman SL, Matsumoto JY, et al. Tremor amplitude is logarithmically related to 4- and 5-point tremor rating scales. *Brain* 2006a;129(Pt 10):2660-6.
- Elble RJ, Tremor Research Group. Report from a U.S. conference on essential tremor. *Mov Disord* 2006b;21(12):2052-61.
- Elble RJ, Dubinsky RM, Ala T. Alzheimer's disease and essential tremor finally meet. *Mov Disord* 2007;22(11):1525-7.
- Elble R, Comella C, Fahn S, et al. Reliability of a new scale for essential tremor. *Mov Disord* 2012;27(12):1567-9.
- Elble RJ. What is essential tremor. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013a;13(6):353
- Elble RJ, Bain P, Forjaz MJ, et al. Task force report: scales for screening and evaluating tremor: critique and recommendations. *Mov Disord* 2013b;28(13):1793-800
- Elble RJ. The essential tremor syndromes. *Curr Opin Neurol*. 2016 Aug;29(4):507-12.
- Elia M, Musumeci SA, Ferri R, Scuderi C, Del Gracco S, Bottitta M, et al. Familial cortical tremor, epilepsy, and mental retardation: a distinct clinical entity? *Arch Neurol*. 1998 Dec;55(12):1569-73.
- Emamalizadeh B, Jamshidi J, Movafagh A, Ohadi M, Khaniani MS, Kazeminasab S, et al. RIT2 Polymorphisms: Is There a Differential Association? *Mol Neurobiol*. 2016 Mar 3. [Epub ahead of print]
- Erickson-Davis CR, Faust PL, Vonsattel JP, Gupta S, Honig LS, Louis ED. "Hairy baskets" associated with degenerative Purkinje cell changes in essential tremor. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Mar;69(3):262-71
- Errichiello L, Pezzella M, Santulli L, Striano S, Zara F, Minetti C, Mainardi P, Striano P. A proof-of-concept trial of the whey protein alpha-lactalbumin in chronic cortical myoclonus. *Mov Disord*. 2011; 26:2573-2575.
- Exome Variant Server. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). Seattle, WA: 2012. URL: <http://evsg.washington.edu/EVS/> [06/2013]
- Exome Variant Server. (2015) NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA. Accessed at <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (07/2015).
- Fabbrini G, Berardelli I, Falla M, et al. Psychiatric disorders in patients with essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18(8):971-3.
- Fahn S, Tolosa E, Marín C. Clinical rating scale for tremor. In: Jankovic J, Tolosa E, editors. *Parkinson's disease and movement disorders*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1993, 225-34.
- Fang W, Lv F, Luo T, et al. Abnormal regional homogeneity in patients with essential tremor revealed by resting-state functional MRI. *PLoS One* 2013;8(7) e69199.
- Fasano A, Herzog J, Raethjen J, et al. Gait ataxia in essential tremor is differentially modulated by thalamic stimulation. *Brain* 2010;133(Pt 12):3635-48.

- Fasano A, Herzog J, Raethjen J, et al. Lower limb joints kinematics in essential tremor and the effect of thalamic stimulation. *Gait Posture* 2012;36(2):187-93.
- Fekete R, Jankovic J. Revisiting the relationship between essential tremor and Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011;26(3):391-8.
- Fernandez KM, Roemmich RT, Stegemoller EL, et al. Gait initiation impairments in both essential tremor and Parkinson's disease. *Gait Posture* 2013;38(4):956-61.
- Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, Bruns GA, Haines JL, Trofatter JA, Hanson MP, Rich J, McFarlane H, Yasek DM et al. Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science* 1990; 250: 1000–1002.
- Finis K, Sultmann H, Ruschhaupt M, Bunes A, Helmchen B, Kuner R, et al. Analysis of pigmented villonodular synovitis with genome-wide complementary DNA microarray and tissue array technology reveals insight into potential novel therapeutic approaches. *Arthritis & Rheumatology* 2006; 54:1009–1019.
- Fukuoka S, Ishiguro K, Yanagihara K, Tanabe A, Egashira Y, Sanada H, Shibata K. Identification and expression of a cDNA encoding human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde de-carboxylase (ACMSD). A key enzyme for the tryptophan-niacine pathway and “quinolinate hypothesis”. *J Biol Chem*. 2002; 277:35162–35167
- Fukuwatari T, Ohsaki S, Fukuoka S, Sasaki R, Shibata K. Phthalate esters enhance quinolinate production by inhibiting alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD), a key enzyme of the tryptophan pathway. *Toxicol Sci*. 2004; 81:302–308.
- Gallea C, Popa T, García-Lorenzo D, Valabregue R, Legrand AP, Marais L, et al. Intrinsic signature of essential tremor in the cerebello-frontal network. *Brain* 2015; 138: 2920–33.
- García-Martín E, Martínez C, Alonso-Navarro H, Benito-León J, Lorenzo-Betancor O, Pastor P, et al. Gamma-aminobutyric acid GABRA4, GABRE, and GABRQ receptor polymorphisms and risk for essential tremor. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21: 436-9.
- Garcia-Martin E, Martinez C, Alonso-Navarro H, et al. H1-MAPT and the risk for familial essential tremor. *PLoS One* 2012;7(7): e41581.
- Gasparini M, Bonifati V, Fabrizio E, et al. Frontal lobe dysfunction in essential tremor: a preliminary study. *J Neurol* 2001;248(5):399-402.
- Gerasimou G, Costa DC, Papanastasiou E, et al. SPECT study with I-123-loflupane (DaTSCAN) in patients with essential tremor. Is there any correlation with Parkinson's disease? *Ann Nucl Med* 2012;26(4):337-44.
- Gerbin M, Viner AS, Louis ED. Sleep in essential tremor: a comparison with normal controls and Parkinson's disease patients. *Park. Relat. Disord*.2012;18: 279–284
- Ghaemi M, Raethjen J, Hilker R, et al. Monosymptomatic resting tremor and Parkinson's disease: a multi-tracer positron emission tomographic study. *Mov Disord* 2002;17(4):782-8.
- Gibson WS, Jo HJ, Testini P, Cho S, Felmlee JP, Welker KM, Klassen BT, Min HK, Lee KH. Functional correlates of the therapeutic and adverse effects evoked by thalamic stimulation

- for essential tremor. *Brain*. 2016 Aug;139(Pt 8):2198-210
- Gironell A, Kulisevsky J, Pascual-Sedano B, Barbanj M. Routine neurophysiologic tremor analysis as a diagnostic tool for essential tremor: a prospective study. *J Clin Neurophysiol* 2004;21(6):446-50
 - Gironell A, Figueiras FP, Pagonabarraga J, et al. Gaba and serotonin molecular neuroimaging in essential tremor: a clinical correlation study. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18(7):876-80
 - Gironell A, Ribosa-Nogué R, Gich I, Marin-Lahoz J, Pascual-Sedano B. Severity stages in essential tremor: a long-term retrospective study using the glass scale. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2015 Mar 13; 5:299.
 - Gironell A, Marin-Lahoz J. La esencia del temblor esencial: bases neuroquímicas. *Rev Neurol*. 2016 Jun 1;62(11):507-15.
 - Gitchee GT, Wetzel PA, Baron MS. Slowed saccades and increased square wave jerks in essential tremor. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 2013; Sep 3;3. pii: tre-03-178-4116-2.
 - Goetz CG. Early Iconography of Parkinson's disease. In: Pahwa R, Lyons K, editors. *Handbook of Parkinson's disease*. 4th ed. New York, NY: Informa Healthcare USA, 2007:14-5.
 - Gövert F, Becktepe JS, Deuschl G. Current concepts of essential tremor. *Rev Neurol (Paris)*. 2016 Aug - Sep;172(8-9):416-422.
 - Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, et al. Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain* 2002;125(Pt 8):1760-71.
 - Grosse P, Cassidy MJ, Brown P. EEG-EMG, MEG-EMG and EMG-EMG frequency analysis: physiological principles and clinical applications. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol*. 2002 Oct;113(10):1523–31.
 - Guerrini R, Bonanni P, Patrignani A, Brown P, Parmeggiani L, Grosse P, et al. Autosomal dominant cortical myoclonus and epilepsy (ADCME) with complex partial and generalized seizures: A newly recognized epi-lepsy syndrome with linkage to chromosome 2p11.1-q12.2. *Brain J Neurol*. 2001 Dec;124(Pt 12):2459–75.
 - Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 2004; 17:455–461.
 - Gulcher JR, Jonsson P, Kong A, et al. Mapping of a familial essential tremor gene, FET1, to chromosome 3q13. *Nat Genet* 1997;17(1):84-7.
 - Gustafsen C, Glerup S, Pallesen LT, Olsen D, Andersen OM, Nykjaer A, et al. Sortilin and SorLA display distinct roles in processing and trafficking of amyloid precursor protein. *Journal of Neuroscience* 2013; 33: 64–71.
 - Ha SW, Yang YS, Song IU, Chung YA, Oh JK, Chung SW. Changes in regional brain glucose metabolism measured with F-18-FDG-PET in essential tremor. *Acta Radiol*. 2015 Apr;56(4):482-6

- Hagerman RJ, Leavitt BR, Farzin F, et al. Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet* 2004;74(5):1051-6.
- Hall DA, Berry-Kravis E, Jacquemont S, et al. Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology* 2005;65(2):299-301.
- Hallett M, Dubinsky RM. Glucose metabolism in the brain of patients with essential tremor. *J Neurol Sci* 1993;114: 45–8.
- Hallett M. Physiology of psychogenic movement disorders. *J Clin Neurosci* 2010;17(8):959-65.
- Hallett M. Tremor: pathophysiology. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(Suppl 1): S118-22.
- Handforth A, Homanics GE, Covey DF, Krishnan K, Lee JY, Sakimura K, Martin FC, Quesada A. T-type calcium channel antagonists suppress tremor in two mouse models of essential tremor. *Neuropharmacology*. 2010 Nov;59(6):380-7
- Hardesty DE, Maraganore DM, Matsumoto JY, Louis ED. Increased risk of head tremor in women with essential tremor: longitudinal data from the Rochester Epidemiology Project. *Mov Disord* 2004;19(5):529-33.
- Harrington, A. W., Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J. C., Lee, R., Morl, K, Giehl, K. M. (2004). Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 6226–6230.
- Hassan A, Ahlskog JE, Matsumoto JY, Milber JM, Bower JH, Wilkinson JR. Orthostatic tremor: Clinical, electrophysiologic, and treatment findings in 184 patients. *Neurology*. 2016 Feb 2;86(5):458-64.
- Haubenberger D, Kalowitz D, Nahab FB, et al. Validation of digital spiral analysis as outcome parameter for clinical trials in essential tremor. *Mov Disord* 2011;26(11):2073-80.
- Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, et al. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*. 2012;489 (7416):391-399
- Hedera P, Phibbs FT, Fang JY, Cooper MK, Charles PD, Davis TL. Clustering of dystonia in some pedigrees with autosomal dominant essential tremor suggests the existence of a distinct subtype of essential tremor. *BMC Neurol* 2010; 10:66.
- Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992; 356:441–443.
- Hellwig B, Häussler S, Schelter B, et al. Tremor-correlated cortical activity in essential tremor. *Lancet* 2001;357(9255):519-23.
- Hellwig B, Mund P, Schelter B, Guschlbauer B, Timmer J, Lüicking CH. A longitudinal study of tremor frequencies in Parkinson's disease and essential tremor. *Clin Neurophysiol* 2009;120(2):431-5.
- Helmchen C, Hagenow A, Miesner J, et al. Eye movement abnormalities in essential tremor may indicate cerebellar dysfunction. *Brain* 2003;126(Pt 6):1319-32.

- Helmich RC, Toni I, Deuschl G, Bloem BR. The pathophysiology of essential tremor and Parkinson's tremor. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013 Sep;13(9):378.
- Hicks JE, Konidari I, Scott BL, Stajich JM, Ashley-Koch AE, Gilbert JR, Scott WK. Linkage of familial essential tremor to chromosome 5q35. *Mov Disord*. 2016 Feb 26. doi: 10.1002/mds.26582.
- Higgins JJ, Pho LT, Nee LE. A gene (ETM) for essential tremor maps to chromosome 2p22-p25. *Mov Disord* 1997;12(6):859-64.
- Higgins JJ, Loveless JM, Jankovic J, Patel PI. Evidence that a gene for essential tremor maps to chromosome 2p in four families. *Mov Disord* 1998; 13:972-7
- Higgins JJ, Jankovic J, Lombardi RQ, Pucilowska J, Tan EK, Ashizawa T, et al. Haplotype analysis of the ETM2 locus in familial essential tremor. *Neurogenetics* 2003; 4:185-9.
- Higgins JJ, Lombardi RQ, Pucilowska J, Jankovic J, Tan EK, Rooney JP. A variant in the HS1-BP3 gene is associated with familial essential tremor. *Neurology* 2005;64(3):417-21.
- Higgins JJ, Lombardi RQ, Pucilowska J, Jankovic J, Golbe LI, Verhagen L. HS1-BP3 gene variant is common in familial essential tremor. *Mov Disord* 2006;21(3):306-9.
- Hitomi T, Kobayashi K, Jingami N, Nakagawa T, Imamura H, Matsumoto R, Kondo T, Chin K, Takahashi R, Ikeda A. Increased clinical anticipation with maternal transmission in benign adult familial myoclonus epilepsy in Japan. *Epileptic Disord*. 2013 Dec;15(4):428-32.
- Hopfner F, Bungeroth M, Pendziwiat M, et al. Rare variants in ANO3 are not a susceptibility factor in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(1):134-5.
- Hopfner F, Erhart T, Knudsen K, Lorenz D, Schneider SA, Zeuner KE, Deuschl G, Kühlenbäumer G. Testing for alcohol sensitivity of tremor amplitude in a large cohort with essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Aug;21(8):848-51
- Hopfner F, Haubenberger D, Galpern WR, Gwinn K, Van't Veer A, White S, et al. Knowledge gaps and research recommendations for essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Oct 4. pii: S1353-8020(16)30389-3.
- Hopfner F, Ahlf A, Lorenz D, Klebe S, Zeuner KE, Kühlenbäumer G, Deuschl G. Early- and late-onset essential tremor patients represent clinically distinct subgroups. *Mov Disord*. 2016b Oct;31(10):1560-1566
- Hor H, Francescatto L, Bartesaghi L, Ortega-Cubero S, Kousi M, Lorenzo-Betancor O, et al. Missense mutations in TENM4, a regulator of axon guidance and central myelination, cause essential tremor. *Hum Mol Genet*. 2015 Oct 15;24(20):5677-86
- Hoskovicova M, Ulmanova O, Sprdlik O, et al. Disorders of balance and gait in essential tremor are associated with midline tremor and age. *Cerebellum* 2013;12(1):27-34.
- Hossen A, Muthuraman M, Al-Hakim Z, Raethjen J, Deuschl G, Heute U. Discrimination of Parkinsonian tremor from essential tremor using statistical signal characterization of the spectrum of accelerometer signal. *Biomed Mater Eng* 2013;23(6):513-31.
- Hsu YD, Chang MK, Sung SC, Hsein HH, Deng JC. Essential tremor: clinical, electromyographical and pharmacological studies in 146 Chinese patients. *Zhonghua Yi Xue*

Za Zhi (Taipei) 1990;45(2):93-9.

- Hu F, Padukkavidana T, Vaegter C B, Brady O A, Zheng Y, Mackenzie I R, et al. Sortilin mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 2010; 68:654–667.
- Hua SE, Lenz FA. Posture-related oscillations in human cerebellar thalamus in essential tremor are enabled by voluntary motor circuits. *J Neurophysiol* 2005;93(1):117-27.
- Hubble JP, Busenbark KL, Pahwa R, Lyons K, Koller WC. Clinical expression of essential tremor: effects of gender and age. *Mov Disord* 1997;12(6):969-72.
- Ikeda A, Kakigi R, Funai N, Neshige R, Kuroda Y, Shibasaki H. Cortical tremor: a variant of cortical reflex myoclonus. *Neurology* 1990; 40:1561–1565.
- Illarioshkin SN, Rakhmonov RA, Ivanova-Smolenskaia IA, et al. Molecular genetic analysis of essential tremor [Article in Russian]. *Genetika* 2002;38(12):1704-9.
- Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, et al. Lysosomal-associated protein multispansing transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. *PLoS One* 2009; 4: e7099.
- Inzelberg R, Mazarib A, Masarwa M, Abuful A, Strugatsky R, Friedland RF. Essential tremor prevalence is low in Arabic villages in Israel: door-to-door neurological examinations. *J Neurol* 2006;253(12):1557-60.
- Isaias IU, Canesi M, Benti R, et al. Striatal dopamine transporter abnormalities in patients with essential tremor. *Nucl Med Commun* 2008;29(4):349-53.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, et al. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet* 2003;72(4):869-78.
- Jain S, Lo SE, Louis ED. Common misdiagnosis of a common neurological disorder: how are we misdiagnosing essential tremor. *Arch Neurol* 2006;63(8):1100-4.
- Jankovic J. Essential tremor: a heterogeneous disorder. *Mov Disord* 2002;17(4):638-44.
- Janicki SC, Cosentino S, Louis ED. The cognitive side of essential tremor: what are the therapeutic implications? *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2013; 6:353–368
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J. R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S., Nykjaer, A. (2007). Roles for the proneurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nature Neuroscience*, 10, 1449–1457.
- Johnson N. Whole-exome sequencing in neurologic practice. *Neurol Genet* 2015;1: e3
- Jeanneteau F, Funalet B, Jankovic J, et al. A functional variant of the dopamine D3 receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(28):10753-8.
- Jellinger KA. Is there cerebellar pathology in essential tremor? *Mov Disord* 2014;29(4):435-6.

- Jia L, Jia-Lin S, Qin D, Qing L, Yan Z. A diffusion tensor imaging study in essential tremor. *J Neuroimaging* 2011;21(4):370-4.
- Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, García-Martín E, Agúndez JA. The relationship between Parkinson's disease and essential tremor: review of clinical, epidemiologic, genetic, neuroimaging and neuropathological data, and data on the presence of cardinal signs of parkinsonism in essential tremor. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2012;2. pii: tre-02-75-409-3.
- Karkheiran S, Krebs CE, Makarov V, Nilipour Y, Hubert B, Darvish H, Frucht S, Shahidi GA, Buxbaum JD, Paisan-Ruiz C. Identification of COL6A2 mutations in progressive myoclonus epilepsy syndrome. *Hum Genet*. 2013; 132:275–283.
- Kim JS, Park JW, Kim WJ, Kim HT, Kim YI, Lee KS. Disappearance of essential tremor after frontal cortical infarct. *Mov Disord* 2006;21(8):1284-5.
- Klebe S, Stolze H, Gensing K, Volkmann J, Wenzelburger R, Deuschl G. Influence of alcohol on gait in patients with essential tremor. *Neurology* 2005;65(1):96-101.
- Klein JC, Lorenz B, Kang JS, Baudrexel S, Seifried C, van de Loo S, Steinmetz H, Deichmann R, Hilker R. Diffusion tensor imaging of white matter involvement in essential tremor. *Hum Brain Mapp*. 2011 Jun;32(6):896-904
- Koehler PJ, Keyser A. Tremor in Latin texts of Dutch physicians: 16th-18th centuries. *Mov Disord* 1997;12(5):798-806.
- Koster B, Lauk M, Timmer J, et al. Involvement of cranial muscles and high intermuscular coherence in orthostatic tremor. *Ann Neurol* 1999;45(3):384-8.
- Koster B, Deuschl G, Lauk M, Timmer J, Guschlbauer B, Lucking CH. Essential tremor and cerebellar dysfunction: abnormal ballistic movements. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73(4):400-5.
- Kovach MJ, Ruiz J, Kimonis K, et al. Genetic heterogeneity in autosomal dominant essential tremor. *Genet Med* 2001;3(3):197-9.
- Kralic JE, Criswell HE, Osterman JL, O'Buckley TK, Wilkie ME, Matthews DB, Hamre K, Breese GR, Homan-ics GE, Morrow AL. Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knock-out mice. *J. Clin. Invest.* 2005;115: 774–779
- Krebs, C.E., Karkheiran, S., Powell, J.C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., Di Paolo, G., Walker, R.H., Shahidi, G.A., Buxbaum, J.D. et al. The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum. Mutat* 2013; 34, 1200–1207
- Kristeva R, Patino L, Omlor W. Beta-range cortical motor spectral power and corticomuscular coherence as a mechanism for effective corticospinal interaction during steady-state motor output. *Neuroimage* 2007; 36: 785–92.
- Kronenbuerger M, Gerwig M, Brol B, Block F, Timmann D. Eyeblink conditioning is impaired in subjects with essential tremor. *Brain* 2007;130(Pt 6):1538-51.
- Kronenbuerger M, Tronnier VM, Gerwig M, et al. Thalamic deep brain stimulation improves eyeblink conditioning deficits in essential tremor. *Exp Neurol* 2008;211(2):387-96.

- Kronenbuerger M, Konczak J, Ziegler W, et al. Balance and motor speech impairment in essential tremor. *Cerebellum* 2009;8(3):389-98.
- Kuhlenbaumer G, Hopfner F, Deuschl G. Genetics of essential tremor: meta-analysis and review. *Neurology* 2014;82(11):1000-7.
- Kumru H, Valls-Sole J, Valldeoriola F, Marti MJ, Sanegre MT, Tolosa E. Transient arrest of psychogenic tremor induced by contralateral ballistic movements. *Neurosci Lett* 2004;370 (2-3):135-9.
- Kumru H, Begeman M, Tolosa E, Valls-Sole J. Dual task interference in psychogenic tremor. *Mov Disord* 2007;22(14):2077-82.
- Kuo SH, Tang G, Louis ED, et al. Lingo-1 expression is increased in essential tremor cerebellum and otheris present in the basket cell pinceau. *Acta Neuropathol* 2013;125(6):879-89.
- Kuo SH, Wang J, Tate WJ, Pan MK, Kelly GC, Gutierrez J, Cortes EP, Vonsattel JG, Louis ED, Faust PL. Cerebellar Pathology in Early Onset and Late Onset Essential Tremor. *Cerebellum*. 2016 Oct 10. [Epub ahead of print]
- Kurgansky M, Frolov A, Ioffe M, Karabanov A, Chernikova L. A comparative kinematic analysis of cyclical bending in patients with early stages of Parkinson's disease and in patients with essential tremor. *Motor Control*. 2014 Oct;18(4):331-46
- Kurtis MM. Essential tremor: is it a neurodegenerative disease. No. *J Neural Transm* 2012;119(11):1375-81; discussion 1373.
- Labauge P, Amer LO, Simonetta-Moreau M, Attané F, Tannier C, Clanet M, et al. Absence of linkage to 8q24 in a European family with familial adult myoclonic epilepsy (FAME). *Neurology*. 2002 Mar 26;58(6):941-4
- Lapin IP. Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm*. 1978; 42:37-4
- Lapin IP. Kynurenines and seizures. *Epilepsia*. 1981; 22:257-265
- Lacerte A, Chouinard S, Jodoin N, Bernard G, Rouleau GA, Panisset M. Increased Prevalence of Non-Motor Symptoms in Essential Tremor. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2014 Sep 2; 4:162
- Larsson T, Sjogren T. Essential tremor: a clinical and genetic population study. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1960;36(144):1-176.
- Lee MS, Marsden CD. Movement in disorders following lesions of the thalamus or subthalamic region. *Mov Disord* 1994; 9:493-507.
- Lee, S.C., Kim, H.S., Park, Y.E., Choi, Y.C., Park, K.H. and Kim, D.S. Clinical Diversity of SCN4A-Mutation-Associated Skeletal Muscle Sodium Channelopathy. *J. Clin. Neurol.* 2009; 5: 186-191.
- Lee W C, Almeida S, Prudencio M, Caulfield T R, Zhang Y J, Tay WM, et al. Targeted manipulation of the sortilin-progranulin axis rescues progranulin haploinsufficiency. *Human*

Molecular Genetics 2013; 23: 1467–1478.

- Lee SM, Kim M, Lee HM, Kwon KY, Koh SB. Nonmotor symptoms in essential tremor: Comparison with Parkinson's disease and normal control. *J Neurol Sci.* 2015 Feb 15;349(1-2):168-73.
- Leehey MA, Munhoz RP, Lang AE, et al. The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch Neurol* 2003;60(1):117-21.
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016 Aug 17;536(7616):285-91
- Li, H. and Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatic-ics.* 2009 ; 25 :1754–1760.
- Li ZW, Xie MJ, Tian DS, et al. Characteristics of depressive symptoms in essential tremor. *J Clin Neurosci* 2011;18(1):52-6.
- Li J, Hu X, Chen Q, Zhang Y, Zhang Y, Hu G. A Chinese benign adult familial myoclonic epilepsy pedigree suggesting linkage to chromosome 5p15.31-p15.1. *Cell Biochem Biophys* 2014;69(3):627-31.
- Lim SY, Poon YY, Chen R, Mikulis D, Lozano AM, Moro E. Marked reduction of tremor in essential tremor after putaminal infarct. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81(10):1172-3.
- Lin CY, Louis ED, Faust PL, Koeppen AH, Vonsattel JP, Kuo SH. Abnormal climbing fibre-Purkinje cell syn-aptic connections in the essential tremor cerebellum. *Brain.* 2014 Dec;137(Pt 12):3149-
- Lion-Francois L, Mignot C, Vicart S, Manel V, Sternberg D, Landrieu P, Lesca G, Broussolle E, Billette de Villemeur T, Napuri S. et al. Severe neonatal episodic laryngospasm due to de novo SCN4A mutations: a new treatable disorder. *Neurology* 2012; 75: 641–645.
- Liu X, Hernandez N, Kisselev S, Floratos A, Sawle A, Ionita-Laza I, Ottman R, Louis ED3, Clark LN. Identifi-cation of candidate genes for familial early-onset essential tremor. *Eur J Hum Genet.* 2015 Oct 28. doi: 10.1038/ejhg.2015.228.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantita-tive PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402–408
- Lombardi WJ, Woolston DJ, Roberts JW, Gross RE. Cognitive deficits in patients with essential tremor. *Neurology* 2001;57(5):785-90.
- Lopez-de-Ipiña I, Bergareche A, De la Riva P, Faundez-Zanuy M, Calvo PM, Roure J, Sesá-Nogueras E. Automatic non-linear analysis of non-invasive writing signals, applied to essential tremor. *Journal of Applied Logic*; 2015:6 March. doi: 10.1016/j.jal.2015.02.003
- López de Munain. Limitaciones actuales para la implantación de la Medicina personalizada en los hospitales españoles.
- http://instituto-roche.es/Biotecnologia/genomicaAplicada/97/Limitaciones_actuales_para_la_i_mplantacion_de_la_Medicina_personalizada_en_los_hospitales_espanoles.
- Lorenz D, Frederiksen H, Moises H, Kopper F, Deuschl G, Christensen K. High concordance for essential tremor in monozygotic twins of old age. *Neurology* 2004;62(2):208-11.

- Lorenz D, Schwieger D, Moises H, Deuschl G. Quality of life and personality in essential tremor patients. *Mov Disord*. 2006 Aug;21(8):1114-8.
- Lorenz D, Papengut F, Frederiksen H, et al. Evaluation of a screening instrument for essential tremor. *Mov Disord* 2008;23(7):1006-12.
- Lorenz D, Poremba C, Papengut F, Schreiber S, Deuschl G. The psychosocial burden of essential tremor in an outpatient- and a community-based cohort. *Eur J Neurol* 2011;18(7):972-9.
- Louis ED, Marder K, Cote L, Pullman S, Ford B, Wilder D, et al. Differences in the prevalence of essential tremor among elderly African-Americans, Whites and Hispanics in Northern Manhattan, NY. *Arch Neurol*;1995; 52: 1201–1205
- Louis ED, Ottman R. How familial is familial tremor. The genetic epidemiology of essential tremor. *Neurology* 1996;46(5):1200-5.
- Louis ED, Ottman R, Ford B, et al. The Washington Heights-Inwood Genetic Study of Essential Tremor: methodologic issues in essential-tremor research. *Neuroepidemiology*. 1997;16(3):124–133.
- Louis ED, Ford B, Bismuth B. Reliability between two observers using a protocol for diagnosing essential tremor. *Mov Disord* 1998a;13(2):287-93.
- Louis ED, Ford B, Lee H, Andrews H. Does a screening questionnaire for essential tremor agree with the physician's examination? *Neurology* 1998b;50(5):1351-7.
- Louis ED, Ford B, Lee H, Andrews H, Cameron G. Diagnostic criteria for essential tremor: a population perspective. *Arch Neurol* 1998c;55(6):823-8.
- Louis ED, Wendt KJ, Pullman SL, Ford B. Is essential tremor symmetric. Observational data from a community-based study of essential tremor. *Arch Neurol* 1998d;55(12):1553-9.
- Louis ED, Ford B, Barnes LF. Clinical subtypes of essential tremor. *Arch Neurol* 2000;57(8):1194-8.
- Louis ED, Barnes L, Albert SM, Cote L, Schneier FR, Pullman SL, Yu Q. Correlates of functional disability in essential tremor. *Mov Disord*. 2001 Sep;16(5):914-20
- Louis ED, Barnes L, Wendt KJ, et al. A teaching videotape for the assessment of essential tremor. *Mov Disord* 2001a;16(1):89-93.
- Louis ED, Dure LS 4th, Pullman S. Essential tremor in childhood: a series of nineteen cases. *Mov Disord* 2001b;16(5):921-3.
- Louis ED, Ford B, Frucht S, Barnes LF, X-Tang M, Ottman R. Risk of tremor and impairment from tremor in relatives of patients with essential tremor: a community-based family study. *Ann Neurol* 2001c;49(6):761-9.
- Louis ED, Pullman SL. Comparison of clinical vs. electrophysiological methods of diagnosing of essential tremor. *Mov Disord*. 2001d; 16:668–673
- Louis ED, Bromley SM, Jurewicz EC, Watner D. Olfactory dysfunction in essential tremor: a

deficit unrelated to disease duration or severity. *Neurology*, 2002; 59:1631–1633

- Louis ED, Shungu DC, Chan S, Mao X, Jurewicz EC, Watner D. Metabolic abnormality in the cerebellum in patients with essential tremor: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Neurosci Lett* 2002a;333(1):17-20.
- Louis ED, Applegate LM, Factor-Litvak P, Parides MK, Andrews L. Essential tremor: occupational exposures to manganese and organic solvents. *Neurology* 2004a;63(11):2162-4.
- Louis ED, Jurewicz EC, Applegate L, Luchsinger JA, Factor-Litvak P, Parides M. Semiquantitative study of current coffee, caffeine, and ethanol intake in essential tremor cases and controls. *Mov Disord* 2004b;19(5):499-504.
- Louis ED. Behavioral symptoms associated with essential tremor. *Adv Neurol*. 2005; 96:284-90.
- Louis ED, Fernandez-Alvarez E, Dure LS 4th, Frucht S, Ford B. Association between male gender and pediatric essential tremor. *Mov Disord* 2005b;20(7):904-6.
- Louis ED, Applegate LM, Borden S, Moskowitz C, Jin Z. Feasibility and validity of a modified finger-nose-finger test. *Mov Disord* 2005c;20(5):636-9.
- Louis ED, Rios E, Applegate LM, Hernandez NC, Andrews HF. Jaw tremor: prevalence and clinical correlates in three essential tremor case samples. *Mov Disord* 2006;21(11):1872-8.
- Louis ED, Faust PL, Vonsattel JP, et al. Neuropathological changes in essential tremor: 33 cases compared with 21 controls. *Brain*. 2007a Dec;130(Pt 12):3297–3301
- Louis ED, Zheng W, Mao X, Shungu DC. Blood harmaline is correlated with cerebellar metabolism in essential tremor: a pilot study. *Neurology* 2007b;69(6):515-20.
- Louis ED, Broussolle E, Goetz CG, Krack P, Kaufmann P, Mazzoni P. Historical underpinnings of the term essential tremor in the late 19th century. *Neurology* 2008a;71(11):856-9.
- Louis ED, Keating GA, Bogen KT, Rios E, Pellegrino KM, Factor-Litvak P. Dietary epidemiology of essential tremor: meat consumption and meat cooking practices. *Neuroepidemiology* 2008b;30(3):161-6.
- Louis ED, Benito-Leon J, Bermejo-Pareja F. Population-based study of baseline ethanol consumption and risk of incident essential tremor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80(5):494-7.
- Louis ED. Essential tremors: a family of neurodegenerative disorders. *Arch Neurol* 2009a;66(10):1202-8
- Louis ED. Factor analysis of motor and nonmotor signs in essential tremor: are these signs all part of the same underlying pathogenic process. *Neuroepidemiology* 2009b;33(1):41-6.
- Louis ED. Functional correlates of lower cognitive test scores in essential tremor. *Mov Disord* 2010;25(4):481-5
- Louis ED, Ferreira JJ. How common is the most common adult movement disorder? Update

on the world-wide prevalence of essential tremor. *Mov Disord* 2010a;25(5):534-41.

- Louis ED, Jiang W, Gerbin M, Mullaney MM, Zheng W. Relationship between blood harmaline and harmine concentrations in familial essential tremor, sporadic essential tremor and controls. *Neurotoxicology* 2010b;31(6):674-9.
- Louis ED, Okun MS. It is time to remove the 'benign' from the essential tremor label. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011 Aug;17(7):516-20.
- Louis ED, Faust PL, Ma KJ, Yu M, Cortes E, Vonsattel JP. Torpedoes in the cerebellar vermis in essential tremor cases vs. controls. *Cerebellum* 2011b;10(4):812-9.
- Louis ED, Factor-Litvak P, Gerbin M, et al. Blood harmaline, blood lead, and severity of hand tremor: Evidence of additive effects. *Neurotoxicology* 2011c;32(2):227-32.
- Louis ED, Huey ED, Gerbin M, Viner AS. Apathy in essential tremor, dystonia, and Parkinson's disease: a comparison with normal controls. *Mov. Disord*. 2012; 27: 432–434
- Louis ED, Faust PL, Vonsattel JP. Purkinje cell loss is a characteristic of essential tremor: towards a more mature understanding of pathogenesis. *Parkinsonism Relat Disord* 2012a;18(8):1003-4.
- Louis ED, Jiang W, Gerbin M, Viner AS, Factor-Litvak P, Zheng W. Blood harmaline (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b] indole) concentrations in essential tremor: repeat observation in cases and controls in New York. *J Toxi-col Environ Health A* 2012b;75(12):673-83.
- Louis ED, Ma K, Babij R, et al. Neurofilament protein levels: quantitative analysis in essential tremor cerebellar cortex. *Neurosci Lett* 2012c;518(1):49-54.
- Louis ED, Mazzoni P, Ma KJ, et al. Essential tremor with ubiquitinated intranuclear inclusions and cerebellar degeneration. *Clin Neuropathol* 2012d;31(3):119-26.
- Louis ED, Rao AK, Gerbin M. Functional correlates of gait and balance difficulty in essential tremor: balance confidence, near misses and falls. *Gait Posture* 2012e;35(1):43-7.
- Louis ED, Zhao Q, Meng H, Ding D. Screening for action tremor in epidemiological field surveys: assessing the reliability of a semi-quantitative, visual, template-based scale for rating hand-drawn spirals. *Tremor Other Hyperkinet Mov (NY)* 2012f; 2:46.
- Louis ED. The primary type of tremor in essential tremor is kinetic rather than postural: cross-sectional observation of tremor phenomenology in 369 cases. *Eur J Neurol* 2013;20(4):725-7.
- Louis ED, Babij R, Cortes E, Vonsattel JP, Faust PL. The inferior olivary nucleus: a postmortem study of essential tremor cases versus controls. *Mov Disord* 2013a;28(6):779-86.
- Louis ED. When do essential tremor patients develop head tremor. Influences of age and duration and evidence of a biological clock. *Neuroepidemiology* 2013b;41(2):110-5.
- Louis ED, Babij R, Lee M, Cortes E, Vonsattel JP. Quantification of cerebellar hemispheric purkinje cell linear density: 32 ET cases versus 16 controls. *Mov Disord* 2013c;28(13):1854-9.
- Louis ED, Benito-Leon J, Moreno-Garcia S, et al. Blood harmaline (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]

- indole) concentration in essential tremor cases in Spain. *Neurotoxicology* 2013d; 34:264-8
- Louis ED, Factor-Litvak P, Liu X, et al. Elevated brain harmaline (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole) in essential tremor cases vs. controls. *Neurotoxicology* 2013e; 38:131-5.
 - Louis ED, Ottman R. Is there a one-way street from essential tremor throughout the world to Parkinson's disease? Possible biological ramifications. *Eur J Neurol* 2013f;20(11):1440-4.
 - Louis ED, Hernandez N, Alcalay RN, Tirri DJ, Ottman R, Clark LN. Prevalence and features of unreported dystonia in a family study of "pure" essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2013g;19(3):359-62.
 - Louis ED, Huang CC, Dyke JP, Long Z, Dydak U. Neuroimaging studies of essential tremor: how well do these studies support/refute the neurodegenerative hypothesis. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 2014; 4:235.
 - Louis ED, Lee M, Cortes E, Vonsattel J.P, Faust P.L. Matching asymmetry of tremor with asymmetry of postmortem cerebellar hemispheric changes in essential tremor, *Cerebellum* 13 (4) 2014b. 462e470.
 - Louis ED. Utility of the hand-drawn spiral as a tool in clinical-epidemiological research on essential tremor: data from four essential tremor cohorts. *Neuroepidemiology*. 2015;44(1):45-50.
 - Louis ED. Non-motor symptoms in essential tremor: A review of the current data and state of the field. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016a Jan;22 Suppl 1: S115-8.
 - Louis ED, Clark L, Ottman R. Familial Aggregation and Co-Aggregation of Essential Tremor and Parkinson's Disease. *Neuroepidemiology*. 2016b;46(1):31-6.
 - Louis ED, Wise A, Alcalay RN, Rao AK, Factor-Litvak P. Essential tremor-Parkinson's disease: A double whammy. *J Neurol Sci*. 2016 Jul 15;366:47-51.
 - Ludlow CL. Treatment of speech and voice disorders with botulinum toxin. *JAMA* 1990; 264:2671-5.
 - Ma, S., Davis, T.L., Blair, M.A., Fang, J.Y., Bradford, Y., Haines, J. L. and Hedera, P. Familial essential tremor with apparent autosomal dominant inheritance: ¿should we also consider other inheritance modes? *Mov. Disord*. 2006; 21:1368–1374.
 - Madia F, Striano P, Di Bonaventura C, de Falco A, de Falco FA, Manfredi M, Casari G, Striano S, Minetti C, Zara F. Benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME): evidence of an extended founder haplotype on chromosome 2p11.1-q12.2 in five Italian families. *Neurogenetics*. 2008 May;9(2):139-42.
 - Makarov, V., O'Grady, T., Cai, G., Lihm, J., Buxbaum, J.D. Yoon, S. AnnTools: a comprehensive and versatile annotation toolkit for genomic variants. *Bioinformatics*. 2011; 28: 724–725.
 - Makino C, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N, Fukumaki Y. Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2D gene, GRIN2D, and association study with schizophrenia. *Psychiatric Genetics* 2005; 15: 215–221.
 - Mally J, Baranyi M, Vizi ES. Change in the concentrations of amino acids in CSF and serum

- of patients with essential tremor. *J. Neural. Transm.* 1996; 103,555–560.
- Manabe Y, Narai H, Warita H, Hayashi T, Shiro Y, Sakai K, et al. Benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) with night blindness. *Seizure.* 2002 Jun;11(4):266–8
 - Mao X, Wang T, Liu M, et al. Meta-analysis of the influence of DRD3 Ser9Gly variant on susceptibility for essential tremor. *J Clin Neurosci* 2013;20(12):1644-9.
 - Marin-Lahoz J, Gironell A. Linking Essential Tremor to the Cerebellum: Neurochemical Evidence. *Cerebellum.* 2016 Jun;15(3):243-52
 - Marsden CD, Obeso JA, Rothwell JC. Benign essential tremor is not a single entity. In: Yahr MD, editor. *Current Concepts of Parkinson's Disease and Related Disorders.* Amsterdam: Excerpta Medica; 1983. pp. 31–46
 - Martikainen MH, Paivarinta M, Hietala M, Kaasinen V. Clinical and imaging findings in Parkinson disease associated with the A53E SNCA mutation. *Neurol Genet* 2015; 1: e27.
 - Marti-Masso, JF., Bergareche, A., Makarov, V., Ruiz-Martinez, J., Gorostidi, A., de Munain, A. L., Paisan-Ruiz, C. (2013). The ACMSD gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, 91, 1399–1406.
 - Martí Massó JF, Zarranz JJ, Otaegui D, López de Munain A. Neurogenetic disorders in the Basque population. *Ann Hum Genet.* 2015 Jan;79(1):57-75
 - Masuhr F, Wissel J, Muller J, Scholz U, Poewe W. Quantification of sensory trick impact on tremor amplitude and frequency in 60 patients with head tremor. *Mov Disord* 2000;15(5):960-4.
 - McAuley JH, Rothwell JC, Marsden CD, Findley LJ. Electrophysiological aids in distinguishing organic tremor from psychogenic tremor. *Neurology* 1998;50(6):1882-4.
 - Mehndiratta MM, Satyawani M, Gupta S, Khwaja GA. Clinical and surface EMG characteristics of valproate induced tremors. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.* 2005; 45: 177–182.
 - Meisler MH, Kearney J, Escayg A, MacDonald BT, Sprunger LK. Sodium channels and neurological disease: insights from Scn8a mutations in the mouse. *Neuroscientist* 2001;7, 136–145
 - Meneghini F, Rocca WA, Anderson DW, Grigoletto F, Morgante L, Reggio A, Savettieri G, Di Perri R. Validating screening instruments for neuroepidemiologic surveys: Experience in Sicily. *J Clin Epidemiol* 1992; 45 :319–331.
 - Merner ND, Girard SL, Catoire H, et al. Exome sequencing identifies FUS mutations as a cause of essential tremor. *Am J Hum Genet* 2012;91(2):313-9.
 - Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 2011; 77:1629–1635.
 - Mikami M, Yasuda T, Terao A, Nakamura M, Ueno S, Tanabe H, et al. Localization of a

gene for benign adult familial myoclonic epilepsy to chromosome 8q23.3-q24.1. *Am J Hum Genet.* 1999 Sep;65(3):745–51.

- Minen MT, Louis ED. Emergence of Parkinson's disease in essential tremor: a study of the clinical correlates in 53 patients. *Mov Disord* 2008;23(11):1602-5.
- Morgan JC, Sethi KD. Drug-induced tremors. *Lancet Neurol* 2005;4(12):866-76.
- Mori S, Nakamura M, Yasuda T, Ueno S, Kaneko S, Sano A. Remapping and mutation analysis of benign adult familial myoclonic epilepsy in a Japanese pedigree. *J Hum Genet.* 2011 Oct;56(10):742-7.
- Mori S, Bernardi R, Laurent A, Resnati M, Crippa A, Gabrieli A, Keough R, Gonda TJ, Blasi F. Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) is essential for early embryonic development, controls cell cycle and mitosis, and acts as a tumor suppressor. *PLoS One.* 2012; 7:e39723
- Morita S, Miwa H, Kondo T. [A case of the familial essential myoclonus and epilepsy presenting behavioral arrest]. *Nō Shinkei Brain Nerve.* 2003 Apr;55(4):345–8
- Mostile G, Giuffrida JP, Adam OR, Davidson A, Jankovic J. Correlation between Kinesia system assessments and clinical tremor scores in patients with essential tremor. *Mov Disord* 2010a;25(12):1938-43.
- Mostile G, Jankovic J. Alcohol in essential tremor and other movement disorders. *Mov Disord* 2010b;25(14):2274-84.
- Mostile G, Fekete R, Giuffrida JP, et al. Amplitude fluctuations in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18(7):859-63.
- Mougnot D, Gähwiler BH. Presynaptic GABAB receptors modulate IPSPs evoked in neurons of deep cerebellar nuclei in vitro. *J Neurophysiol* 1996; 75: 894-901
- Müller SH, Girard SL, Hopfner F, Merner ND, Bourassa CV, Lorenz D, et al. Genome-wide association study in essential tremor identifies three new loci. *Brain.* 2016 Oct 20. pii: aww242. [Epub ahead of print]
- Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs KV, et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 210; 466: 714–719.
- Muthuraman M, Deuschl G, Anwar AR, Mideksa KG, von Helmolt F, Schneider SA. Essential and aging-related tremor: Differences of central control. *Mov Disord.* 2015 Oct;30(12):1673-80.
- Nagayama S, Kishikawa H, Yukitake M, Matsui M, Kuroda Y. [A case of familial myoclonus showing extremely benign clinical course]. *Rinshō Shinkeigaku Clin Neurol.* 1998 May;38(5):430–4.
- Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simon-Sanchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjornsdottir S, Stefansson K, Martinez M, Hardy J, Heutink P, Brice A, Gasser T, Singleton AB, Wood NW. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet.* 2011; 377:641–649.

- Neely KA, Kurani AS, Shukla P, et al. Functional brain activity relates to 0-3 and 3-8 Hz force oscillations in essential tremor. *Cereb Cortex*. 2015 Nov;25(11):4191-202.
- Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattacharjee A, Eichler EE, Bamshad M, Nickerson DA, Shendure J. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes.
- Nicole, S. and Fontaine, B. Skeletal muscle sodium channelopathies. *Curr.Opin. Neurol.*2015; 28: 508-514.
- Nicoletti G, Manners D, Novellino F, et al. Diffusion tensor MRI changes in cerebellar structures of patients with familial essential tremor. *Neurology* 2010;74(12):988-94.
- Nicoletti V, Cecchi P, Frosini D, Pesaresi I, Fabbri S, Diciotti S, Bonuccelli U, Cosottini M, Ceravolo R. Morphometric and functional MRI changes in essential tremor with and without resting tremor. *J Neurol*. 2015 Mar;262(3):719-28
- Nicoletti A, Luca A, Luca M, Donzuso G, Mostile G, Raciti L, Contrafatto D, Dibilio V, Sciacca G1 Cicero CE, Vasta R, Petralia A, Zappia M. Obsessive compulsive personality disorder in Progressive Supranuclear Palsy, Multiple System Atrophy and Essential Tremor. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Sep;30:36-9.
- Nielsen MS, Madsen P, Christensen E I, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, et al. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *The EMBO Journal* 2001; 20: 2180–2190.
- Nistico R, Pirritano D, Salsone M, et al. Synchronous pattern distinguishes resting tremor associated with essential tremor from rest tremor of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17 (1):30-3.
- Nistico R, Pirritano D, Novellino F, et al. Blink reflex recovery cycle in patients with essential tremor associated with resting tremor. *Neurology* 2012;79(14):1490-5.
- Nistico R, Salsone M, Vescio B, et al. Blink reflex recovery cycle distinguishes essential tremor with resting tremor from de novo Parkinson's disease: an exploratory study. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(2):153-6.
- Novellino F, Cherubini A, Chiriaco C, et al. Brain iron deposition in essential tremor: a quantitative 3-Tesla magnetic resonance imaging study. *Mov Disord* 2013;28(2):196-200.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427, 843–848.
- Nykjaer A, Willnow T E. Sortilin: A receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences* 2012; 35, 261–270.
- O'Suilleabhain PE, Matsumoto JY. Time-frequency analysis of tremors. *Brain* 1998;121(Pt 11):2127-34.
- Ogura C, Nakamoto H, Uema T, Yakamoto K, Yonemori T, Yoshimura T, et al: Prevalence of senile dementia in Okinawa, Japan. *Int J Epidemiol* 1995; 24:373–380.
- Okuma Y, Shimo Y, Hatori K, Hattori T, Tanaka S, Mizuno Y. Familial cortical tremor with epilepsy. *Parkinsonism Relat Disord*. 1997 Apr;3(2):83–7.

- Ondo WG, Sutton L, Dat Vuong K, Lai D, Jankovic J. Hearing impairment in essential tremor. *Neurology* 2003;61(8):1093-7.
- Ozel L, Demir R, Ozdemir G, et al. Investigation of the prevalence of essential tremor in individuals aged 18-60 in Erzurum. *Acta Neurol Belg* 2013;113(2):127-31.
- Pagan FL, Butman JA, Dambrosia JM, Hallett M. Evaluation of essential tremor with multi-voxel magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 2003;60(8):1344-7.
- Pahapill PA, Levy R, Dostrovsky JO, et al. Tremor arrest with thalamic microinjections of muscimol in patients with essential tremor. *Ann Neurol* 1999;46(2):249-52.
- Pan JJ, Lee M, Honig LS, Vonsattel JP, Faust PL, Louis ED. Alzheimer's-related changes in non-demented essential tremor patients vs. controls: links between tau and tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(6):655-8.
- Papengut F, Raethjen J, Binder A, Deuschl G. Rest tremor suppression may separate essential from parkinsonian rest tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19(7):693-7.
- Paris-Robidas S, Brochu E, Sintès M, et al. Defective dentate nucleus GABA receptors in essential tremor. *Brain* 2012;135(Pt 1):105-16.
- Parisi SL, Heroux ME, Culham EG, Norman KE. Functional mobility and postural control in essential tremor. *Arch Phys Med Rehabil* 2006;87(10):1357-64.
- Park YG, Park HY, Lee CJ, Choi S, Jo S, Choi H, Kim YH, Shin HS, Llinas RR, Kim D. Ca(V)_{3.1} is a tremor rhythm pacemaker in the inferior olive. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 8;107(23):10731-6.
- Pasini E, Busolin G, Nobile C, Michelucci R. Autosomal dominant essential tremor: a novel family with anticipation. *Neurol Sci* 2013;34(5):761-3.
- Pedrosa DJ, Reck C, Florin E, et al. Essential tremor and tremor in Parkinson's disease are associated with distinct 'tremor clusters' in the ventral thalamus. *Exp Neurol* 2012;237:435-43.
- Pedrosa DJ, Nelles C, Maier F, Eggers C, Burghaus L, Fink GR, Wittmann M, Timmermann L. Time reproduction deficits in essential tremor patients. *Mov Disord*. 2016 Apr 19. doi: 10.1002/mds.26630
- 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(4):559-63.
- Phibbs F, Fang JY, Cooper MK, Charles DP, Davis TL, Hedera P. Prevalence of unilateral tremor in autosomal dominant essential tremor. *Mov Disord* 2009;24(1):108-11.
- Piboolnurak P, Rothery N, Ahmed A, et al. Psychogenic tremor disorders identified using tree-based statistical algorithms and quantitative tremor analysis. *Mov Disord* 2005a;20(12):1543-9.
- Piboolnurak P, Yu QP, Pullman SL. Clinical and neurophysiologic spectrum of orthostatic tremor: case series of 26 subjects. *Mov Disord* 2005b;20(11):1455-61.

- Pigullo S, Di Maria E, Marchese R, Bellone E, Gulli R, Scaglione C, et al. Essential tremor is not associated with alpha-synuclein gene haplotypes. *Mov Disord* 2003; 18:823-6
- Pigullo S, De Luca A, Barone P, Marchese R, Bellone E, Colosimo A, et al. Mutational analysis of parkin gene by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2004; 10:357-62.
- Ptacek LJ, George AL. Jr, Barchi RL, Griggs RC, Riggs JE, Robertson M, Leppert MF. Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron* 1992; 8: 891–897.
- Pranzatelli MR, Tate E, Galvan I, Wheeler A. A controlled trial of 5-hydroxy-L-tryptophan for ataxia in pro-gressive myoclonus epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg.* 1996; 98:161–164
- Pulliam CL, Eichenseer SR, Goetz CG, Waln O, Hunter CB, Jankovic J, Vaillancourt DE, Giuffrida JP, Heldman DA. Continuous in-home monitoring of essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Jan;20(1):37-40.
- Puschmann A, Wszolek ZK. Diagnosis and treatment of common forms of tremor. *Semin Neurol.* 2011 Feb;31(1):65-77
- Quattrone A, Cerasa A, Messina D, et al. Essential head tremor is associated with cerebellar vermis atrophy: a volumetric and voxel-based morphometry MR imaging study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29(9):1692-7
- Quinn NP, Schneider SA, Schwingenschuh P, Bhatia KP. Tremor--some controversial aspects. *Mov Disord* 2011;26(1):18-23.
- Rahman A, Ting K, Cullen KM, Braidy N, Brew BJ, Guillemin GJ. The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons. *PLoS One.* 2009; 4:e6344.
- Raethjen J, Lindemann M, Schmaljohann H, Wenzelburger R, Pfister G, Deuschl G. Multiple oscillators are causing parkinsonian and essential tremor. *Mov Disord* 2000;15: 84–94.
- Raethjen J, Kopper F, Govindan RB, Volkmann J, Deuschl G. Two different pathogenetic mechanisms in psychogenic tremor. *Neurology* 2004;63(5):812-5.
- Raethjen J, Govindan RB, Kopper F, Muthuraman M, Deuschl G. Cortical involvement in the generation of essential tremor. *J Neurophysiol* 2007;97:3219–28.
- Raethjen J, Deuschl G. The oscillating central network of essential tremor. *Clin Neurophysiol* 2012;123(1):61-4.
- Rajput AH, Rozdilsky B, Ang L, Rajput A. Significance of parkinsonian manifestations in essential tremor. *Can J Neurol Sci* 1993;20(2):114-7.
- Rajput AH, Robinson CA, Rajput AH. Essential tremor course and disability: A clinicopathologic study of 20 cases. *Neurology* 2004;62(6):932-6.
- Rajput AH, Adler CH, Shill HA, Rajput A. Essential tremor is not a neurodegenerative disease. *Neurodegener Dis Manag* 2012a;2(3):259-68.
- Rajput AH, Robinson CA, Rajput ML, Robinson SL, Rajput A. Essential tremor is not

- dependent upon cerebellar Purkinje cell loss. *Parkinsonism Relat Disord* 2012b;18(5):626-8.
- Rajput AH, Robinson CA, Rajput A. Purkinje cell loss is neither pathological basis nor characteristic of essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19(4):490-1.
 - Rajput A, Rajput AH, Rajput ML, et al. Identification of FUS p.R377W in essential tremor. *Eur J Neurol* 2014;21(2):361-3.
 - Rajput A, Ross JP, Bernales CQ, Rayaprolu S, Soto-Ortolaza AI, Ross OA, van Gerpen J, Uitti RJ, Wszolek ZK, Rajput AH, Vilarinho-Güell C. VPS35 and DNAJC13 disease-causing variants in essential tremor. *Eur J Hum Genet.* 2015 Jun;23(6):887-8
 - Rangroo-Thrane, V., Thrane, A.S., Wang, F., Cotrina, M.L., Smith, N.A., Chen, M., Xu, Q., Kang, N., Fujita, T., Nagelhus, E.A. et al. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nat. Med.* 2013; 19:1643-1648.
 - Rao AK, Uddin J, Gillman A, Louis ED. Cognitive motor interference during dual-task gait in essential tremor. *Gait Posture* 2013;38(3):403-9.
 - Rao AK, Gilman A, Louis ED. Balance confidence and falls in nondemented essential tremor patients: the role of cognition. *Arch Phys Med Rehabil.* 2014 Oct;95(10):1832-7
 - Riffault B, Medina I, Dumon C, Thalman C, Ferrand N, Friedel P, et al. Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABA_A receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* 2014; 34:13516–13534.
 - Rivest J, Marsden CD. Trunk and head tremor as isolated manifestations of dystonia. *Mov Disord* 1990;5(1):60-5.
 - Rocca WA, Bower JH, Ahlskog JE, et al. Increased risk of essential tremor in first-degree relatives of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22(11):1607-14.
 - Roemmich RT, Zeilman PR, Vaillancourt DE, Okun MS, Hass CJ. Gait variability magnitude but not structure is altered in essential tremor. *J Biomech* 2013;46(15):2682-7.
 - Romero JP, Benito-Leon J, Bermejo-Pareja F. The NEDICES Study: recent advances in the understanding of the epidemiology of essential tremor. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 2012;2.
 - Ross OA, Conneely KN, Wang T, et al. Genetic variants of α -synuclein are not associated with essential tremor. *Mov Disord* 2011;26(14):2552-6.
 - Roostaei T, Sadaghiani S, Park MT, Mashhadi R, Nazeri A, Noshad S et al. Channelopathy-related SCN10A gene variants predict cerebellar dysfunction in multiple sclerosis. *Neurology.* 2016 Feb 2;86(5):410-7
 - Ruonala V, Meigal A, Rissanen SM, Airaksinen O, Kankaanpää M, Karjalainen PA. EMG signal morphology and kinematic parameters in essential tremor and Parkinson's disease patients. *J Electromyogr Kinesiol* 2014;24(2):300-6.
 - Routakorpi I, Takala RJ, Marttila J, Sievers K, Rinne U: Essential tremor in a Finnish population. *Acta Neurol Scand* 1982; 66:58–67.

- Sahin HA, Terzi M, Ucak S, Yapici O, Basoglu T, Onar M. Frontal functions in young patients with essential tremor: a case comparison study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2006;18(1):64-72.
- Said G, Bathien N, Cesaro P. Peripheral neuropathies and tremor. *Neurology* 1982; 32:480
- Saini J, Bagepally BS, Bhatt MD, et al. Diffusion tensor imaging: tract based spatial statistics study in essential tremor. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18(5):477-82.
- Saka E, Saygi S. Familial adult onset myoclonic epilepsy associated with migraine. *Seizure*. 2000 Jul;9(5):344–6.
- Sakakibara S, Aiba I, Saito Y, Inukai A, Ishikawa K, Mizusawa H. Clinical features and MRI findings in spino-cerebellar ataxia type 31 (SCA31) comparing with spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *Rinsho Shinkeigaku*. 2014;54 :473–479
- Salemi G, Savettieri G, Rocca WA, et al: Prevalence of essential tremor: A door-to-door survey in Terrasini, Sicily. *Neurology* 1994; 44:61–64.
- Sander HW, Masdeu JC, Tavoulareas G, Walters A, Zimmerman T, Chokroverty S. Orthostatic tremor: an electrophysiological analysis. *Mov Disord* 1998;13(4):735-8.
- Scarneas N, Louis ED. Mediterranean diet and essential tremor. A case-control study. *Neuroepidemiology* 2007;29(3-4):170-7.
- Schiebler S, Schmidt A, Zittel S, et al. Arm tremor in cervical dystonia--is it a manifestation of dystonia or essential tremor. *Mov Disord* 2011;26(10):1789-92.
- Schneider SA, Edwards MJ, Mir P, et al. Patients with adult-onset dystonic tremor resembling parkinsonian tremor have scans without evidence of dopaminergic deficit (SWEDDs). *Mov Disord* 2007;22(15):2210-5.
- Schneier FR, Barnes LF, Albert SM, Louis ED. Characteristics of social phobia among persons with essential tremor. *J Clin Psychiatry*. 2001 May;62(5):367-72.
- Schnitzler A, Munks C, Butz M, Timmermann L, Gross J. Synchronized brain network associated with essential tremor as revealed by magnetoencephalography. *Mov Disord* 2009;24(11):1629-35.
- Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004;3(5):291-304.
- Schottmann G, Seelow D, Seifert F, et al. Recessive REEP1 mutation is associated with congenital axonal neuropathy and diaphragmatic palsy. *Neurol Genet* 2015;1:
- Schrag A, Münchau A, Bhatia KP, Quinn NP, Marsden CD. Essential tremor: an overdiagnosed condition. *J Neurol* 2000;247(12):955-9.
- Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci*. 2012; 13:465–477.
- Sengul Y, Sengu SH, Yucekaya SK, Yucel S, Bakim B, Pazarci NK, et al. Cognitive functions, fatigue, de-pression, anxiety, and sleep disturbances: assessment of nonmotor features in young patients with essential tremor. *Acta Neurol. Belg.* 2015;115 (3): 281–287.

- Shah M, Muhammed N, Findley LJ, Hawkes CH. Olfactory tests in the diagnosis of essential tremor. *Parkin-sonism Relat Disord* 2008;14(7):563-8.
- Shaikh, AG., Miura, K., Optican, L.M., Ramat, S., Tripp, R.M. and Zee, D.S. Hypothetical membrane mecha-nisms in essential tremor. *J. Transl. Med.*, 2008; 6, 68.
- Shatunov A, Jankovic J, Elble R, et al. A variant in the HS1-BP3 gene is associated with familial essential tremor. *Neurology* 2005;65(12):1995.
- Shatunov A, Sambuughin N, Jankovic J, et al. Genome wide scans in North American families reveal genetic linkage of essential tremor to a region on chromosome 6p23. *Brain* 2006;129(Pt 9):2318-31.
- Shieh C, Moser F, Graham JM Jr, Watiker V, Pierson TM. Mutation in the sixth immunoglobulin domain of L1CAM is associated with migrational brain anomalies. *Neurol Genet.* 2015 Nov 16;1(4):e34.
- Shill HA, Adler CH, Sabbagh MN, et al. Pathologic findings in prospectively ascertained essential tremor subjects. *Neurology* 2008;70(16 Pt 2):1452-5.
- Shill HA, Adler CH, Beach TG, et al. Brain biochemistry in autopsied patients with essential tremor. *Mov Disord* 2012;27(1):113-7.
- Shill HA, Adler CH, Beach TG. Lewy bodies in essential tremor are no different than in controls. *Parkinson-ism Relat Disord.* 2016 Feb; 23:106-7
- Shin DH, Han BS, Kim HS, Lee PH. Diffusion tensor imaging in patients with essential tremor. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29(1):151-3.
- Shin H, Lee DK, Lee JM, Huh YE, Youn J, Louis ED, Cho JW. Atrophy of the Cerebellar Vermis in Essential Tremor: Segmental Volumetric MRI Analysis. *Cerebellum.* 2015 Jun 11. [Epub ahead of print]
- Singer C, Sanchez-Ramos J, Weiner WJ. Gait abnormality in essential tremor. *Mov Disord* 1994;9(2):193-6.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302(5646):841.
- Skipper L, Shen H, Chua E, Bonnard C, Kolatkar P, Tan LC, et al. Analysis of LRRK2 functional domains in nondominant Parkinson disease. *Neurology* 2005; 65:1319-21
- Smith IS, Furness P, Thomas PK. Tremor in peripheral neuropathy. In: Findley LF, Capildeo R, editors. *Mov Disord* 1984; 30:399-406.
- Smith IS. Tremor in peripheral neuropathy. In: Findley LJ, Koller WC, editors. *Handbook of tremor disorders.* New York: M Dekker, 1995:443-54.
- Soden SE, Saunders CJ, Willig LK, et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):265ra168.
- Soland VL, Bhatia KP, Volonte MA, Marsden CD. Focal task-specific tremors. *Mov Disord*

1996;11(6):665-70.

- Stanford JA, Fowler SC. At low doses, harmaline increases forelimb tremor in the rat. *Neurosci Lett* 1998;241(1):41-4.
- Stefansson H, Steinberg S, Petursson H, et al. Variant in the sequence of the LINGO1 gene confers risk of essential tremor. *Nat Genet* 2009;41(3):277-9.
- Stessman, H. A., Bernier, R. & Eichler, E. E. A genotype-first approach to defining the subtypes of a complex disease. *Cell* 156, 872–877 (2014).
- Stogmann E, Reinthaler E, Eltawil S, et al. Autosomal recessive cortical myoclonic tremor and epilepsy: association with a mutation in the potassium channel associated gene CNTN2. *Brain* 2013; 136:1155-60
- Stolze H, Petersen G, Raethjen J, Wenzelburger R, Deuschl G. The gait disorder of advanced essential tremor. *Brain* 2001;124(Pt 11):2278-86.
- Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1:609–620.
- Striano P, Chifari R, Striano S, de Fusco M, Elia M, Guerrini R, et al. A new benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) pedigree suggesting linkage to chromosome 2p11.1-q12.2. *Epilepsia.* 2004 Feb;45(2):190–2.
- Striano P, Madia F, Minetti C, Striano S, Zara F. Electroclinical and genetic findings in a family with cortical tremor, myoclonus, and epilepsy. *Epilepsia.* 2005a Dec;46(12):1993-5.
- Striano P, Zara F, Striano S. Autosomal dominant cortical tremor, myoclonus and epilepsy: many syndromes, one phenotype. *Acta Neurol Scand.* 2005b Apr;111(4):211-7.
- Striano P, D'Amato E, Pezzella M, Mainardi P, Zara F, Striano S. Sudden death in Unverricht-Lundborg patients: is serotonin the key? *Neurol Sci.* 2010; 31:115–116
- Sulica L, Louis ED. Clinical characteristics of essential voice tremor: a study of 34 cases. *Laryngoscope* 2010;120(3):516-28.
- Sullivan KL, Hauser RA, Zesiewicz TA. Essential tremor. *Epidemiology, diagnosis, and treatment. Neurologist* 2004; 10:250-8
- Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenes in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13:465–477.
- Symanski C, Shill HA, Dugger B, et al. Essential tremor is not associated with cerebellar Purkinje cell loss. *Mov Disord* 2014;29(4):496-500.
- Tan EK, Matsuura T, Nagamitsu S, Khajavi M, Jankovic J, Ashizawa T. Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: an etiologic link with essential tremor? *Neurology.* 2000 Mar 14;54(5):1195-8.
- Tan EK, Zhao Y, Puong KY, et al. Fragile X premutation alleles in SCA, ET, and parkinsonism in an Asian cohort. *Neurology* 2004;63(2):362-3
- Tan LC, Venketasubramanian N, Ramasamy V, Gao W, Saw SM. Prevalence of essential

- tremor in Singapore: a study on three races in an Asian country. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11(4):233-9.
- Tan EK, Lum SY, Prakash KM. Clinical features of childhood onset essential tremor. *Eur J Neurol* 2006;13(12):1302-5.
 - Tan EK, Lee SS, Fook-Chong S, Lum SY. Evidence of increased odds of essential tremor in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23(7):993-7.
 - Tan EK, Foo JN, Tan L, Au WL, Prakash KM, Ng E, Ikram MK, Wong TY, Liu JJ, Zhao Y. SLC1A2 variant associated with essential tremor but not Parkinson disease in Chinese subjects. *Neurology*. 2013 Apr 23;80(17):1618-9
 - Tanner CM, Goldman SM, Lyons KE, et al. Essential tremor in twins: an assessment of genetic vs environ-mental determinants of etiology. *Neurology* 2001;57(8):1389-91.
 - Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2005; 25: 5455–5463.
 - Terada K, Ikeda A, Mima T, et al. Familial cortical myoclonic tremor as a unique form of cortical reflex myo-clonus. *Mov Disord* 1997;12(3):370-7.
 - Terada K, Ikeda A, Yazawa S, Nagamine T, Shibasaki H. Movement-related cortical potentials associated with voluntary relaxation of foot muscles. *Clin Neurophysiol*. 1999 Mar;110(3):397-403.
 - Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991;293: 93–96.
 - Testa CM. Key issues in essential tremor genetics research: Where are we now and how can we move for-ward. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2013;3. pii: tre-03-105-1843-1.
 - Thawani SP, Schupf N, Louis ED. Essential tremor is associated with dementia: prospective population-based study in New York. *Neurology*. 2009 Aug 25;73(8):621-5
 - Thenganatt MA, Louis ED. Personality profile in essential tremor: a case-control study. *Park. Relat. Dis-ord.*2012; 18:1042–1044
 - Thenganatt MA, Louis ED. Distinguishing essential tremor from Parkinson's disease: bedside tests and laboratory evaluations. *Expert Rev Neurother*. 2012 Jun;12(6):687-96.
 - Thenganatt MA, Jankovic J. The relationship between essential tremor and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Jan;22 Suppl 1: S162-5
 - Thier S, Kühlenbäumer G, Lorenz D, Nothnagel M, Nebel A, Christensen K, et al. GABAA receptor- and GABA transporter polymorphisms and risk for essential tremor: GABAA receptor genes in essential tremor. *Eur J Neurol* 2011; 18: 1098-100
 - Thier S, Lorenz D, Nothnagel M, et al. Polymorphisms in the glial glutamate transporter SLC1A2 are associ-ated with essential tremor. *Neurology* 2012;79(3):243-8.
 - Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on mis-sense variants. *Hum Mutat*. 2011; 32:358–368.

- Tio M, Wen R, Lim YL, Wang H, Ling SC, Zhao Y, Tan EK. FUS-linked essential tremor associated with motor dysfunction in *Drosophila*. *Hum Genet*. 2016 Nov;135(11):1223-1232.
- Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;5(1):75-86.
- Tröster AI, Woods SP, Fields JA, Lyons KE, Pahwa R, Higginson CI, Koller WC. Neuropsychological deficits in essential tremor: an expression of cerebello-thalamo-cortical pathophysiology? *Eur J Neurol*. 2002 Mar;9(2):143-51.
- Tsujino A, Maertens C, Ohno K, Shen XM, Fukuda T, Harper CM, Cannon SC, Engel AG. Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100: 7377–7382.
- Unal Gulsuner H, Gulsuner S, Mercan FN, Onat OE, Walsh T, et al. Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 23;111(51):18285-90.
- Uusisaari M, Knöpfel T. GABAergic synaptic communication in the GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* 2008; 156: 537-49.
- Uyama E, Fu YH, Ptáček LJ. Familial adult myoclonic epilepsy (FAME). *Adv Neurol*. 2005; 95:281-8.
- Van Rootselaar F, Callenbach PMC, Hottenga JJ, Vermeulen FLMG, Speelman HD, Brouwer OF, et al. A Dutch family with “familial cortical tremor with epilepsy”. Clinical characteristics and exclusion of linkage to chromosome 8q23.3-q24.1. *J Neurol*. 2002 Jul;249(7):829–34.
- Van Rootselaar AF, van Schaik IN, van den Maagdenberg AM, Koelman JH, Callenbach PM, Tijssen MA. Familial cortical myoclonic tremor with epilepsy: a single syndromic classification for a group of pedigrees bearing common features *Mov Disord*. 2005 Jun;20(6):665-73
- Van Rootselaar AF, Maurits NM, Koelman JH, van der Hoeven JH, Bour LJ, Leenders KL, Brown P, Tijssen MA. Coherence analysis differentiates between cortical myoclonic tremor and essential tremor. *Mov Disord*. 2006 Feb;21(2):215-22.
- Vecsei L, Szalardy L, Fulop F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12:64–82.
- Venance SL, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Tawil R. SCN4A-associated hypokalemic periodic paralysis merits a trial of acetazolamide. *Neurology* 2004; 63:1977.
- Vilariño-Güell C, Ross OA, Wider C, Jasinska-Myga B, Cobb SA, Soto-Ortolaza AI, Kachergus JM, Keeling BH, Dachsel JC, Melrose HL, Behrouz B, Wszolek ZK, Uitti RJ, Aasly JO, Rajput A, Farrer MJ. LINGO1 rs9652490 is associated with essential tremor and Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010 Feb;16(2):109-11.
- Vilarino-Guell C, Soto-Ortolaza AI, et al. MAPT H1 haplotype is a risk factor for essential tremor and multiple system atrophy. *Neurology* 2011;76(7):670-2.
- Visser, M., Marinus, J., Stiggelbout, A.M. and Van Hilten, J.J. Assessment of autonomic

- dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT. *Mov. Disord.* 2004; 19: 1306–1312.
- Waln O, Wu Y, Perlman R, Wendt J, Van AK, Jankovic J. Dopamine transporter imaging in essential tremor with and without parkinsonian features. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015 Nov;122(11):1515-21
 - Walsh R, Peters NS, Cook SA, Ware JS. Paralogous annotation identifies novel pathogenic variants in patients with Brugada syndrome and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J. Med. Genet.* 2014; 51:35–44.
 - Wang J, Kelly GC, Tate WJ, Li YS, Lee M, Gutierrez J, Louis ED, Faust PL, Kuo SH. Excitatory Amino acid transporter expression in the essential tremor dentate nucleus and cerebellar cortex: A postmortem study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016 Nov;32:87-93
 - Wendt KJ, Albert SM, Pullman SL, Schneier FR, Louis ED. Columbia University Assessment of Disability in Essential Tremor (CADET): methodological issues in essential tremor research. *Parkinsonism Relat Disord* 2000;6(1):17-23
 - Whaley NR, Putzke JD, Baba Y, Wszolek ZK, Uitti RJ. Essential tremor: phenotypic expression in a clinical cohort. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13(6):333-9.
 - Wile DJ, Ranaway R, Kiss ZH. Smart watch accelerometry for analysis and diagnosis of tremor. *J Neurosci Methods* 2014; 230:1-4.
 - Willnow, T. E., Petersen, C. M., Nykjaer, A. (2008). VPS10P domain receptors – Regulators of neuronal viability and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 899–909.
 - Wolraich D, Vasile Marchis-Crisan C, Redding N, Khella SL, Mirza N. Laryngeal tremor: co-occurrence with other movement disorders. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2010;72(5):291-4.
 - Wu H, Lu X, Cen Z, Xie F, Zheng X, Chen Y, Luo W. Genetic analysis of the CHCHD2 gene in Chinese patients with familial essential tremor. *Neurosci Lett.* 2016 Nov 10;634:104-106
 - Wu HQ, Schwarcz R. Seizure activity causes elevation of endogenous extracellular kynurenic acid in the rat brain. *Brain Res Bull.* 1996; 39:155–162.
 - Wu YR, Foo JN, Tan LC, et al. Identification of a novel risk variant in the FUS gene in essential tremor. *Neurology* 2013;81(6):541-4.
 - Wu Y, Wang X, Wang C, Sun Q, Song N, Zhou Y, Jiang Q, Qiao Y, Xu J, Liang L, Tang H, Ma J, Gao X, Chen SD. Prevalence and clinical features of non-motor symptoms of essential tremor in Shanghai rural area. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015 Nov 4. pii: S1353-8020(15)30023-7.
 - Yang, B., Slonimsky, J. D., & Birren, S. J. A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nature Neuroscience* 2002; 5: 539–545.
 - Ye, X., Robinson, M.B., Pabin, C., Quinn, T., Jawad, A., Wilson, J.M. and Batshaw, M.L. (1997) Adenovirus-mediated in vivo gene transfer rapidly protects ornithine transcarbamylase-deficient mice from an ammonium challenge. *Pediatr. Res.*,41, 527-534.
 - Yeetong P, Ausavarat S, Bhidayasiri R, Piravej K, Pasutharnchat N, Desudchit T, Chunharas C, Lopplumlert J, Limotai C, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. A newly identified locus for

benign adult familial myoclonic epilepsy on chromosome 3q26.32-3q28. *Eur J Hum Genet.* 2013 Feb;21(2):225-8

- Yilmaz NH, Akbostanci MC, Yilmaz N. Sensorineural hearing loss in non-depressed essential tremor cases and controls: A clinical and audiometric study. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y).* 2015 Jan 29; 5:281
- Yin W, Lin W, Li W, Qian S, Mou X. Resting State fMRI Demonstrates a Disturbance of the Cerebello-Cortical Circuit in Essential Tremor. *Brain Topogr.* 2016 Feb 11. [Epub ahead of print]
- Yoo YM, Lee CJ, Lee U, Kim YJ. Mitochondrial DNA in patients with essential tremor. *Neurosci Lett* 2008;434(1):29-34.
- You S, Kim MJ, Kim SR, Kim MJ, Oh M, Kim JS, Chung SJ. Clinical features and nigrostriatal dysfunction in patients with combined postural and resting tremors. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Dec;19(12):1118-22.
- Yu M, Ma K, Faust PL, et al. Increased number of Purkinje cell dendritic swellings in essential tremor. *Eur J Neurol* 2012;19(4):625-30.
- Yu SW, Chen CM, Chen YC, Chang CW, Chang HS, Lyu RK, Ro LS, Wu YR. SLC1A2 variant is associated with essential tremor in Taiwanese population. *PLoS One.* 2013 Aug 8;8(8):e71919
- Zackowski KM, Bastian AJ, Hakimian S, et al. Thalamic stimulation reduces essential tremor but not the delayed antagonist muscle timing. *Neurology* 2002;58(3):402-10.
- Zimprich A. Phenocopies in families with essential tremor and restless legs syndrome challenge Mendelian laws. Epigenetics might provide answers. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18(6):711-6.

ANEXOS

10. ANEXO. ARTICULOS ORIGINALES

10.1 Trabajo 1.

Prevalence of Essential Tremor: A Door-to-Door Survey in Bidasoa, Spain.

A. Bergareche, E. De la Puente, A. López de Munain, C. Sarasqueta, A. De Arce, J.J. Poza, J.F. Martí-Massó.

Neuroepidemiology 2001; 20:125–128

Prevalencia del Temblor Esencial: estudio puerta a puerta en la Comarca del Bidasoa, España.

Objetivo: Evaluar la prevalencia de temblor esencial (TE) en dos poblaciones españolas (Irún y Hondarribia, Comarca del Bidasoa) y comparar los resultados obtenidos con los de estudios similares.

Métodos: El estudio incluyó 2.000 participantes de 65 años o mayores con un diseño de puerta a puerta, en dos fases. El TE se definió como un temblor postural o cinética de la cabeza o las extremidades.

Resultados: La prevalencia del TE una vez ajustado por edad fue del 4,8% (intervalo de confianza del 95%, 3.6-6.4). La prevalencia aumentó significativamente con la edad y no hubo diferencias entre los sexos.

Conclusiones: La tasa de prevalencia del TE en las personas de 65 años de edad o mayores de la Comarca del Bidasoa, España, es similar a las descritas en otros estudios que utilizan un diseño similar y sugieren que no hay variación geográfica. La prevalencia del TE aumenta con la edad y es similar en hombres y mujeres

Prevalence of Essential Tremor: A Door-to-Door Survey in Bidasoa, Spain

A. Bergareche^a E. De la Puente^a A. López de Munain^b C. Sarasqueta^c
A. De Arce^a J.J. Poza^b J.F. Martí-Massó^b

^aDepartment of Neurology, Hospital Bidasoa, Hondarribia, ^bHospital Aranzazu and ^cDepartment of Clinical Epidemiology, San Sebastián, Spain

Key Words

Essential tremor · Survey, door-to-door · Disorders, neurological · Survey, prevalence

Abstract

Objectives: To assess the prevalence of essential tremor (ET) in two Spanish populations (Irun and Hondarribia, Bidasoa region) and to compare the results with those of similar surveys. **Methods:** The survey included 2,000 participants aged 65 years or older in a door-to-door, two-phase design. ET was defined as postural or kinetic tremor of the head or limbs. **Results:** ET prevalence after age adjustment was 4.8% (95% confidence interval, 3.6–6.4). Prevalence increased significantly with age and there were no sex differences. **Conclusions:** The age-adjusted prevalence rate of ET in people 65 years old and older in Bidasoa, Spain, is close to those described in other studies using a similar design and suggest no geographical variation. ET prevalence increases with age and has a similar distribution in males and females.

Copyright © 2001 S. Karger AG, Basel

Introduction

Essential tremor (ET) is the most common movement disorder in adults. Despite the use of the term ‘benign’ many patients are physically and socially handicapped by ET, including some that are totally disabled. ET may go unrecognized in the general population [1]. ET prevalence varies depending on the definition used and the type of study [2]; this is probably due to clinical and genetic heterogeneity and a lack of universally accepted diagnostic criteria. According to Louis et al. [3] ET ranges from 3.7 to 59.3/1,000 over the age of 65 years. Factors that contribute to the broad range of prevalence include differences in study design influencing validity, and in the characteristics of the populations studied, influencing comparability of the studies [3]. We report here the results of a prevalence survey for ET in people older than 65 years in the Bidasoa region, Basque Province, Spain.

Methods

The Bidasoa Study is a community survey of elderly subjects of 65 years or older, living in two municipalities of Bidasoa, Irun and Hondarribia, in the north of Guipuzcoa (Basque Province). According to the 1996 census, there were 13,434 people older than 65 years

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2001 S. Karger AG, Basel
0251-5350/01/0202-0125\$17.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/ned

Alberto Bergareche
Servicio de Neurología, Hospital Bidasoa
E-20280 Hondarribia (Spain)
Tel. +34 94 300 77 00, Fax +34 94 300 77 01
E-Mail abergarechey@meditex.es

Table 1. Diagnostic criteria for ET [modified from 5]

Criteria for ET (all 5 must be true)

- 1 On examination, a +2 postural tremor of at least 1 arm or +2 head tremor
- 2 On examination, there must be
 - (a) a +2 kinetic tremor during at least 4 tasks or
 - (b) a +2 kinetic tremor on 1 task and +3 kinetic tremor on a second task (tasks include pouring water, using a spoon to drink water, drinking water, finger to nose and drawing a spiral)
- 3 If on examination, the tremor is present in the dominant hand, then by report, it must interfere with at least 1 activity of daily living (eating, drinking, writing or using the hands). If on examination, the tremor is not present in the dominant hand, then this criterion is irrelevant
- 4 Medications, alcohol, parkinsonism, dystonia, other basal ganglia disorders and hyperthyroidism are not potential etiologic factors
- 5 No psychogenic (bizarre features, out of character, volatile, subject is distractible) or other psychiatric features on examination

Tremor rating scale

0 = No visible tremor, +1 = low amplitude, barely perceptible tremor or intermittent tremor; +2 = tremor is of moderate amplitude (1–2 cm) and usually present; it is clearly oscillatory; +3 = large amplitude (>2 cm), violent, jerky tremor resulting in difficulty completing the task due to spilling or inability to hold a pen to paper.

and 2,000 of them were selected by aleatory stratified sampling by sex and 2-year age groups. This number allowed us to estimate a prevalence of diseases of 5% or smaller with a precision of 1% and a confidence of 95%. There were approximately 10% 'no answers' in the pilot study. Trained interviewers conducted the first phase and then neurologists from the Aranzazu Hospital (San Sebastián, Spain) and Bidasoa Hospital (Hondarribia, Spain) completed the second phase.

The objective of the Bidasoa Study was to determine the prevalence of dementia, epilepsy, stroke, orofacial dyskinesias, tremor, Parkinson's disease and other forms of parkinsonism. Validation of the Sicilian Neuro-Epidemiologic Study screening instruments (SNES) used by Meneghini et al. [4] was done in a pilot study with 148 interviews. The sensitivity of the SNES was 100% for other pathologies and 75% for tremor. The specificity was 34.7%.

Case Finding Procedures

The study used a two-phase design. In phase 1, participants were screened door-to-door by trained interviewers using the Spanish version of the SNES questionnaire [4]. The screening instrument for tremor asked for the presence of shaking or involuntary movement in the limbs, head, face or tongue, followed by a second question about tremor at rest of the head or limbs, postural tremor or action tremor. Performance assessment was examined by holding both arms extended for 20 s. Further questions inquired about the diagnoses of tremor, Parkinson's disease, use of β -blockers, antiepileptics, dopaminergic agonists and benzodiazepines. Those who screened positive (one positive item) were entered into phase 2, which consisted of a

complete standardized neurological examination performed by a neurologist.

We defined ET as a postural or kinetic tremor of the head or limbs without a recognizable cause. We used stringent diagnostic criteria modified from Louis et al. [5] as follows (table 1). The tremor had to be gradual in onset, present for at least 1 year, or accompanied by family history of the same disorder if present for less than 1 year (at least one first-degree relative affected) [6].

The present survey has several limitations. First, the sensitivity of the screening instrument was 75%. Second, 35% of those who screened positive were not examined in the second phase. Similar methodological problems have occurred in other surveys [3, 7].

Data Analysis

The prevalence estimates are presented by 3-year age groups. To obtain stable prevalence estimates all groups have more than 10 subjects in the denominator. Prevalence was calculated using the method of Ogura et al. [8], but using a sensitivity of 100%. This method assumes that people who screen positive and do not go to the clinic have a similar prevalence to those who go. The confidence intervals of 95% [CI] were calculated following the binomial method. ET prevalence is presented by sex and age groups (65–74, 75–84, ≥ 85). Logistic regression analysis was done to determine a possible association between age and/or sex. The statistic analysis was done using the statistical program SPSS for Windows v. 6 and Epi-Info, v. 6.

Results

The overall study population included 2,000 subjects aged 65 years or older. From this initial sample (fig. 1), 210 (10.5%) were not eligible due to census mistakes (38 cases), absence (23 cases), having moved (90 cases) and death (59 cases). Of the remaining 1,790 subjects 86.03% responded. There were 222 refusals (12.4%), 26 were absent (1.3%) and 2 were hospitalized. Table 2 shows the distribution by age and sex and the prevalence values. ET prevalence in subjects aged 65 years or older was 4.8% (95% CI, 3.6–6.4). The probability of ET increased with age and no variation as a result of the sex was noted.

Discussion

Estimates of the crude prevalence of ET range widely from 0.08 to 220/1,000. Limiting the data to community-based studies that provide diagnostic criteria for ET, the prevalence ranges from 4.1 to 39.2/1,000, a 9.6-fold difference [2, 3]. Important factors to explain this value include case definition, inclusion of both sporadic and familiar forms, community-based design, and the method of case evaluation, including interviews and examination of the subjects [9].

Study Population Characteristics

Differences in study population characteristics include ethnicity and age [9]; higher prevalences were found in relatively isolated communities [10] and in very old populations [11]. ET is commonly assumed to be partly genetic, but familial estimates vary from 17 to 100% [12]. Our population is homogeneous from the ethnic view point, minimizing the impact of differences in genetic susceptibility [3]. Population-based surveys that use either a total population survey or random sampling are usually more reliable in identifying individuals with tremor [2, 9].

Method of Case Evaluation

Studies failing to examine subjects result in under-ascertainment of ET cases. Louis et al. [13] reported a 60% sensitivity of reported tremor in a screening question and found 1.5% ET diagnoses in the group not reporting tremor. In the Terrasini study [6] 2.8% of the screened population was positive for tremor, and after neurological evaluation 39.4% were found to be affected by tremor and of these 14.5% had ET. Otherwise, 19.4% of subjects with ET answered 'no' to questions regarding the presence of tremor, and were diagnosed by physical exam. In Manhattan [3] 55% of the total population indicated that they had tremor, but 28% of ET-diagnosed patients did not report it. Asymptomatic ET prevalence was as high as that of symptomatic ET in a study of relatives of patients with ET [14]. Our screening instrument (including a motor task) showed a 75% sensitivity but the use of specific anti-parkinsonian drugs and self-reported diagnosis of ET or Parkinson's disease increased this rate. The SNES sensitivity for tremor may be low because neurologists did not screen the study populations and the trained workers who screened people failed to recognize mild ET.

Diagnostic Criteria

The discrepancy in prevalence estimates for ET is presumed to result partly from a lack of universally accepted diagnostic criteria [2, 9]. Lower estimates have been reported with restrictive criteria [9]. Discrimination of normal tremor is crucial for accurate diagnosis of ET in population-based studies [5, 15]. Criteria that specify that only a mild postural or kinetic tremor is sufficient for the diagnosis of ET will probably classify many normal subjects as having ET [9].

Likewise, a positive family history for ET as a diagnostic criterion excludes sporadic cases [16]. Tremor duration before the prevalence day was considered an important diagnostic criterion in some surveys; the times used ranged from 10 years [17], to 1 year [6], to 1 month [7].

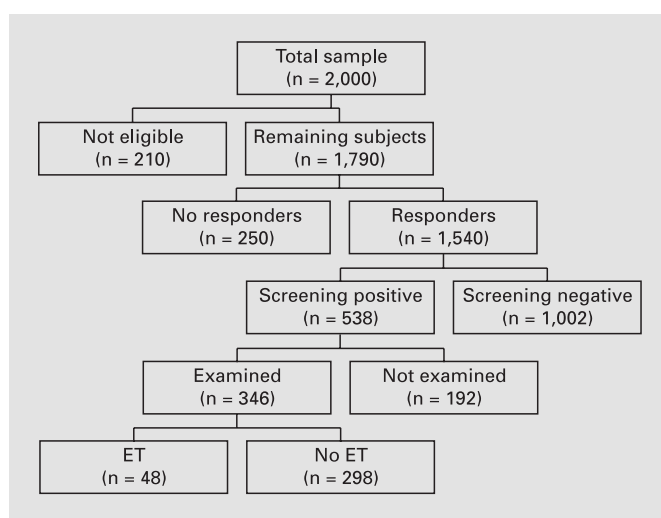


Fig. 1. Overall study population and its subgroups.

Table 2. Results

Age years	Sex	n	Screening positive	A	B	Prevalence	CI
65–74	M	401	94	58	10	4.05	1.9–7.3
	F	513	147	85	10	3.4	1.6–6.1
75–84	M	173	76	55	9	7.2	3.3–10.2
	F	308	141	97	10	4.7	2.3–8.5
≥ 85	M	39	26	15	1	4.4	0.1–22.8
	F	106	54	36	8	11.3	5.0–21.0
Total ≥ 65	M	613	196	128	20	4.9	3.1–7.6
	F	927	342	218	28	4.7	3.2–6.8
		1,540	538	346	48	4.8	3.6–6.4

n = Number of cases; A = number of cases with positive screening and clinical evaluation (second phase); B = number of cases with ET.

The long period of development excludes patients who are unaware of their tremor or who have symptoms for only a limited time. The duration of ET was not important for 58% of movement disorder specialists and the rest stated that 1 year was appropriate [16].

Results

ET prevalence in people older than 70 years has been estimated in many studies and is between 1.3 and 5.6% in some surveys [3, 6, 7, 8] and 9.8% [19], 14% [11] or even

22–23% in others [20, 21]. This variability results from differences in study design. We have compared our results with similar studies, such as those done in Manhattan, USA 1995 [3] (4.02% for subjects older than 65 years) and Bombay, India 1988 [18] (5% for subjects older than 70 years). In 1988, in the Copiah study, (USA) [17], the prevalence (1.3% for patients older than 70 years) was lower than in our study but the diagnostic criteria were very restrictive, including a 10-year duration and positive family history. Salemi et al. [6] (Terrasini, Italy) also found lower rates (1% for the 60- to 69-year age group and 2.9% for the 70- to 79-year age group). Their diagnostic criteria were based on the clinical features of the tremor

but did not specify the range of severity required to accept the diagnosis of ET. Most previous surveys [3, 6, 7, 17, 18] reported a significant increase in prevalence with age, but the rise in ET prevalence in the age groups of 80 and older tended to be modest [3]. We found no differences by sex but a higher prevalence in men has been reported [3, 6, 7].

Acknowledgments

This work was partially supported by FIS grant No. 95/1907 and by a grant from the Health Department of the Basque Government.

References

- Busenbark KL, Nash J, Nash S, et al: Is essential tremor benign? *Neurology* 1991;41:1982–1983.
- Brin MF, Koller W: Epidemiology and genetics of essential tremor. *Mov Disord* 1998;13 (suppl 3):55–63.
- Louis ED, Marder K, Cote L, et al: Differences in the prevalence of essential tremor among elderly African Americans, whites and Hispanics in northern Manhattan, NY. *Arch Neurol* 1995;52:1201–1205.
- Meneghini F, Rocca WA, Anderson DW, Grigoletto F, Morgante L, Reggio A, Savettieri G, Di Perri R: Validating screening instruments for neuroepidemiologic surveys: Experience in Sicily. *J Clin Epidemiol* 1992;45:319–331.
- Louis ED, Ford B, Lee H, Andrews H, Cameron G: Diagnostic criteria for essential tremor. A population perspective. *Arch Neurol* 1998; 55:823–828.
- Salemi G, Savettieri G, Rocca WA, et al: Prevalence of essential tremor: A door-to-door survey in Terrasini, Sicily. *Neurology* 1994;44:61–64.
- Routakorpi I, Takala RJ, Marttila J, Sievers K, Rinne U: Essential tremor in a Finnish population. *Acta Neurol Scand* 1982;66:58–67.
- Ogura C, Nakamoto H, Uema T, Yakamoto K, Yonemori T, Yoshimura T, et al: Prevalence of senile dementia in Okinawa, Japan. *Int J Epidemiol* 1995;24:373–380.
- Louis ED, Ottman R, Hauser WA: How common is the most common adult movement disorder? Estimates of the prevalence of essential tremor throughout the world. *Mov Disord* 1998;13:5–10.
- Hornabrook RW, Nagurney JT: Essential tremor in Papua New Guinea. *Brain* 1976;99: 659–672.
- Moghal S, Rajput AH, Meleth R, D'Arcy C, Rajput R: Prevalence of movement disorders in institutionalized elderly. *Neuroepidemiology* 1995;14/8:297–300.
- Louis ED, Ottman R: How familiar is familiar tremor? The genetic epidemiology of essential tremor. *Neurology* 1996;46:1200–1205.
- Louis ED, Marder K, Cote L, et al: Prevalence of a history of shaking in persons 65 years of age and older: Diagnostic and functional correlates. *Mov Disord* 1996;11:63–69.
- Louis ED, Ford B, Pulmann S: Prevalence of asymptomatic tremor in relatives of patients with essential tremor. *Arch Neurol* 1997;54: 197–200.
- Louis ED, Ford B, Pulmann S, Baron K: How normal is 'normal'? Mild tremor in a multiethnic cohort of normal subjects. *Arch Neurol* 1998;55:222–227.
- Chouinard S, Louis ED, Fahn S: Agreement among movement disorder specialists on the clinical diagnosis of essential tremor. *Mov Disord* 1997;12:973–976.
- Haerer AF, Anderson DW, Schoenberg BS: Prevalence of the essential tremor. Results from the Copiah County study. *Arch Neurol* 1982;39:750–751.
- Bharucha NE, Bharucha EP, Bharucha AE, Brise AV, Schoenberg BS: Prevalence of essential tremor in the Parsi community of Bombay, India. *Arch Neurol* 1988;45:907–908.
- Mateo D, Giménez-Roldán S: Temblor esencial en ancianos: incidencia en ingresos hospitalarios por causas no neurológicas. *Neurología* 1989;4:323–327.
- Lieberman A, Imke S, Brewer M, et al: High prevalence of tremor in a retirement community. *Neurology* 1994;44(suppl):A123.
- Elble RJ: Tremor in ostensibly normal elderly people. *Mov Disord* 1998;13:457–464.

10.2 Trabajo 2.

The *ACMSD* gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism.

José Félix Martí-Massó, Alberto Bergareche, Vladimir Makarov, Javier Ruiz-Martínez, Ana Gorostidi, Adolfo López de Munain, Juan José Poza, Pasquale Striano, Joseph D. Buxbaum, Coro Paisán-Ruiz.

J Mol Med (2013) 91:1399–1406

El gen *ACMSD*, que participa en el metabolismo del triptófano, se encuentra mutado en una familia con mioclonías corticales, epilepsia y parkinsonismo.

El temblor mioclónico cortical familiar con epilepsia es un trastorno autosómico dominante fenotípicamente y genéticamente heterogéneo caracterizado por la presencia de mioclonías de origen cortical, temblor y epilepsia que a menudo se acompaña de alteraciones neurológicas adicionales. A pesar de los numerosos estudios realizados y del número de locus identificados, no hay ningún gen asociado a este síndrome. Es de esperar que a través de la aplicación las nuevas tecnologías genómicas, como es la secuenciación del exoma, un número considerable de nuevos genes salga a la luz en los próximos años. En este estudio, describimos la identificación de dos mutaciones que segregan con la enfermedad en una extensa familia con temblor mioclónico cortical, epilepsia y parkinsonismo. Dada la asociación previamente descrita entre el déficit de *ACMSD* con el desarrollo de crisis epilépticas, concluimos que la mutación identificada en el gen *ACMSD*, que codifica para una enzima crítica de la vía de la kinurenina del metabolismo del triptófano, es probablemente la mutación responsable del fenotipo descrito en nuestra familia. Este hallazgo revela, no solamente la identificación del primer gen asociado con el temblor cortical familiar y epilepsia, sino que también describe a la vía de la kinurenina como una potencial diana terapéutica para el tratamiento de este síndrome devastador.

The ACMSD gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism

Jose Felix Martí-Massó · Alberto Bergareche · Vladimir Makarov ·
Javier Ruiz-Martinez · Ana Gorostidi · Adolfo López de Munain ·
Juan Jose Poza · Pasquale Striano · Joseph D. Buxbaum · Coro Paisán-Ruiz

Received: 13 May 2013 / Revised: 2 July 2013 / Accepted: 29 July 2013 / Published online: 20 August 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Familial cortical myoclonic tremor and epilepsy is a phenotypically and genetically heterogeneous autosomal dominant disorder characterized by the presence of cortical myoclonic tremor and epilepsy that is often accompanied by additional neurological features. Despite the numerous familial studies performed and the number of loci identified, there is no gene associated with this syndrome. It is expected that through the

application of novel genomic technologies, such as whole exome sequencing and whole genome sequencing, a substantial number of novel genes will come to light in the coming years. In this study, we describe the identification of two disease-segregating mutations in a large family featuring cortical myoclonic tremor with epilepsy and parkinsonism. Due to the previous association of ACMSD deficiency with the development of epileptic seizures, we concluded that the identified

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00109-013-1075-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. F. Martí-Massó · A. Bergareche · J. Ruiz-Martinez · A. Gorostidi ·
A. L. de Munain · J. J. Poza
Biodonostia Research Institute, Neurosciences area, University of the
Basque Country, EHU-UPV, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

J. F. Martí-Massó · A. Bergareche · J. Ruiz-Martinez · A. Gorostidi ·
A. L. de Munain · J. J. Poza
Hospital Universitario Donostia, Department of Neurology,
Movement Disorders Unit, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

J. F. Martí-Massó · A. Bergareche · J. Ruiz-Martinez · A. Gorostidi ·
A. L. de Munain · J. J. Poza
Centro de investigación biomédica en Red para enfermedades
Neurodegenerativas (CIBERNED), Carlos III Health Institute,
Madrid, Spain

J. F. Martí-Massó · A. L. de Munain
Department of Neurosciences, University of the Basque Country,
EHU-UPV, San Sebastian, Gipuzkoa, Spain

V. Makarov
Department of Biostatistics, Columbia University, Mailman School
of Public Health, 722 west 168 St, New York, NY 10032, USA

P. Striano
Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit, Department of
Neurosciences-DINOEMI, Gaslini Institute, Genoa, Italy

J. D. Buxbaum · C. Paisán-Ruiz
Department of Psychiatry, Icahn School of Medicine at Mount Sinai,
One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA

J. D. Buxbaum · C. Paisán-Ruiz
Department of Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of
Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York,
NY 10029, USA

J. D. Buxbaum
Department of Neurosciences, Icahn School of Medicine at Mount
Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA

J. D. Buxbaum · C. Paisán-Ruiz
Friedman Brain and Mindich Child Health and Development
Institutes, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L.
Levy Place, New York, NY 10029, USA

C. Paisán-Ruiz (✉)
Department of Neurology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai,
One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA
e-mail: coro.paisan-ruiz@mssm.edu

J. F. Martí-Massó (✉)
Department of Neurology, Hospital Donostia, San Sebastian,
Gipuzkoa, Spain
e-mail: JOSEFELIX.MARTIMASSO@osakidetza.net

nonsense mutation in the *ACMSD* gene, which encodes for a critical enzyme of the kynurenine pathway of the tryptophan metabolism, is the disease-segregating mutation most likely to be responsible for the phenotype described in our family. This finding not only reveals the identification of the first gene associated with familial cortical myoclonic tremor and epilepsy but also discloses the kynurenine pathway as a potential therapeutic target for the treatment of this devastating syndrome.

Key message

- *ACMSD* is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism.
- *ACMSD* mutation contributes to the development of FCMTE
- QA accumulation is likely to play an important role in the pathogenesis of FCMTE.
- The kynurenine pathway as a potential drug target for the treatment of epilepsy.

Keywords FCMTE · Whole exome sequencing · *ACMSD* · Kynurenine Pathway

Introduction

Familial cortical myoclonic tremor and epilepsy (FCMTE), also known as BAFME, FAME, FEME, FCTE, and ADCME, is an autosomal dominant disorder characterized by adult-onset cortical myoclonus, rare epileptic seizures, benign course, and beneficial response to antiepileptic drug therapy; cerebellar ataxia, dementia, and marked photosensitivity may also manifest [1, 2]. Myoclonus is usually the first symptom and is characterized by tremulous finger movements and myoclonus of the extremities [3]. Although diagnosis is made based on clinical and electrophysiological criteria, FCMTE might be misdiagnosed as essential tremor (ET) or progressive myoclonus epilepsy (PME). To avoid confusion and possible misdiagnosis of patients, van Rootselaar and colleagues proposed “familial cortical myoclonic tremor with epilepsy” as unifying term [1]. Four different autosomal dominant FCMTE loci have already been reported. FCMTE1 (8q23.3-q24.11) was identified in a large Japanese family who mainly presented with tremulous finger movement and/or myoclonus of the extremities at an average age of 30.5 years. Previously, familial febrile convulsions and idiopathic generalized epilepsy syndrome were also mapped to chromosome 8q [2]. FCMTE2 (2p11.1-q12.2) was first described in a large pedigree from Tuscany where affected members presented with nonprogressive cortical reflex myoclonus and generalized EEG abnormalities; however, in this family, patients also had focal frontotemporal EEG abnormalities, and some patients ($n=3$) additionally featured complex partial seizures. More Italian families were subsequently mapped to the same locus [4, 5], which was later refined

in two European descent families by positional cloning techniques [6, 7]. FCMTE3 was first described in families from South Africa [8] but later mapped to chromosome 5p15.31-p15.1 in a large French family [3]. FCMTE4 (3q26.32-3q28) has recently been reported in a large family from Thailand, which consisted of 13 affected members and featured clinical symptoms similar to those previously reported [9].

Despite all genetic analyses performed in FCMTE families, no causal gene has been identified. In this context, whole exome sequencing (WES) is dramatically accelerating the field of biomedical research, particularly in Mendelian diseases, and is becoming a fruitful strategy for gene identification. Through the use of WES, novel genes have recently been identified in several neurological diseases, including ET [10], and in families previously deemed statistically underpowered for positional cloning [11]. In this study, we aimed to identify the genetic causes underlying FCMTE in a large Spanish family through the application of WES. As a result, a stop codon mutation (p.Trp26Stop) in the *ACMSD* gene, which is part of the kynurenine pathway, was identified as the disease-segregating mutation. A-amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase (*ACMSD*) deficiency has already been implicated in the genesis of epileptic seizures [12] and has been proved to result in quinolinate accumulation that is thought to be involved in various central nervous system phenomena, including synaptic plasticity and neurodegeneration [13].

We concluded that, while further studies are warranted to establish the molecular mechanisms by which *ACMSD* mutation may contribute to the development of cortical myoclonic tremor, epilepsy, and parkinsonism, both brain-specific kynurenic acid deficiency and quinolinate accumulation are likely to play an important role in the pathogenesis of cortical myoclonic tremor and epilepsy.

Materials and methods

Subjects

A detailed family pedigree was constructed by collecting clinical histories on all putatively affected as well as unaffected individuals and spouses. The inheritance pattern was autosomal dominant. There were seven affected individuals over three different generations, and full clinical evaluation was conducted in four affected individuals (Fig. 1a, Table 1). Written informed consent, fully approved by the local ethics committee at the Hospital Universitario Donostia, was obtained from all participants. All members' DNA samples were isolated from whole blood using standard procedures.

Ninety-four DNA samples belonging to ethnicity-matched neurologically normal individuals (49 females and 45 males) and without family history of any movement disorders were

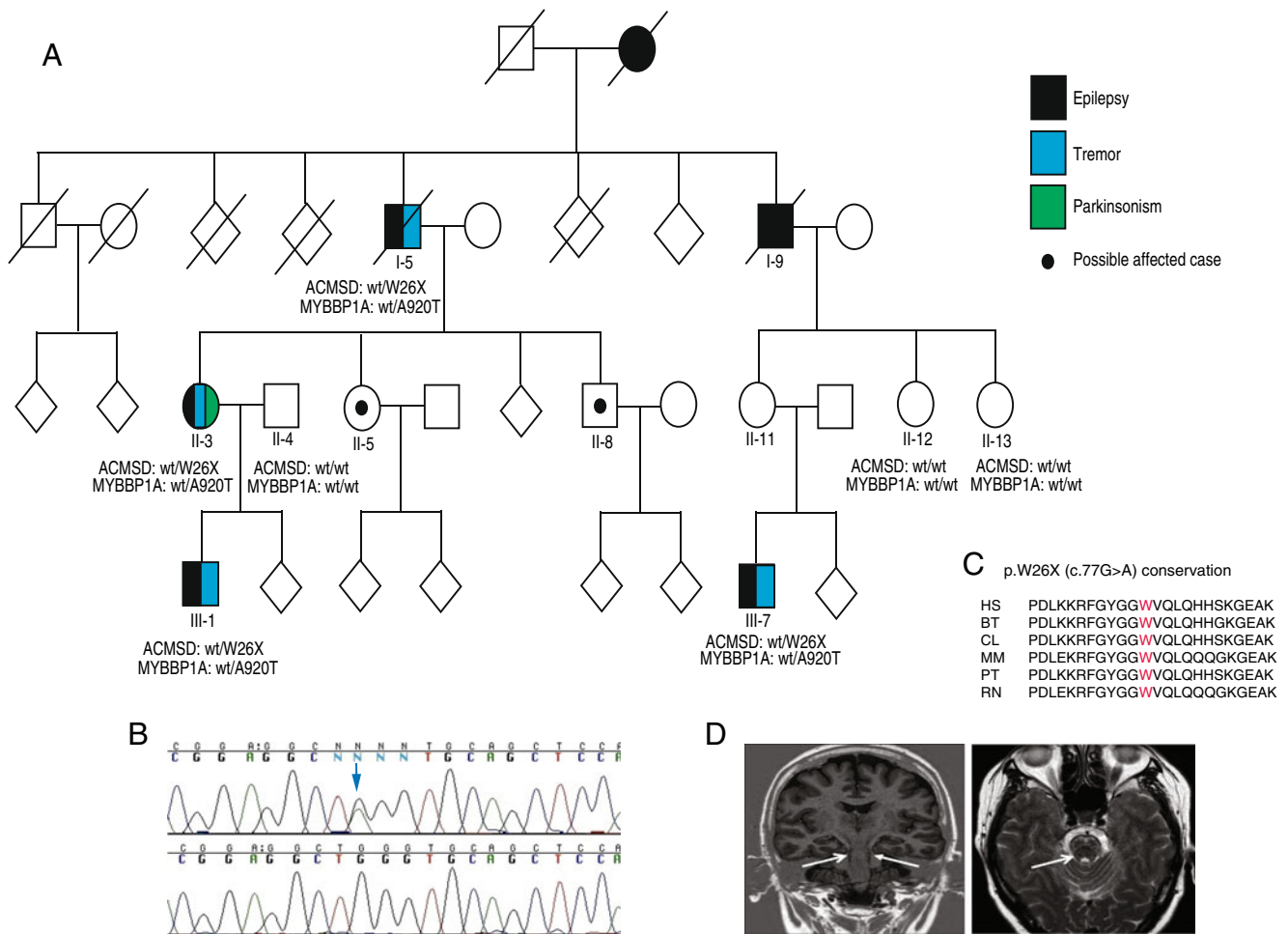


Fig. 1 **a** Pedigree structure of the Spanish family featuring a complex form of FCMTE. Both disease-segregating mutations are shown. **b** Sequence chromatograms showing the ACMSD wild-type mutation sequence at the bottom and the heterozygous ACMSD mutant sequence at the top (blue arrow). **c** ACMSD p.W26X mutation conservation across different species is represented. HS *Homo sapiens*, BT *Bos taurus*, CL *Canis lupus*, MM *Mus musculus*, PT *Pan troglodytes*, RN *Rattus norvegicus*. **d** Brain MRI of patient II-3. Left coronal inversion recovery (IR): hypointense linear signals (arrows) in the corticospinal pathways. Right transversal T2-weighted image showing a high-intensity signals in the brainstem (arrow). Mild vermian cerebellar atrophy is shown

Eleven familial and 58 sporadic cases featuring ET and 54 sporadic cases featuring late-onset Parkinson's disease (LOPD) were additionally available.

also available. The age at sample collection of the control individuals ranged from 60 to 93 years with an average of 69.1 years.

Table 1 Clinical and neurophysiological findings in patients with benign adult familial cortical myoclonic epilepsy

Patient ID	Gender	Age at follow-up	Age at onset of tremor	Age at onset of GTC	EEG	Photic	Giant SEP	Medication	Seizures frequency (Past year)
I-5	M	73	20	17	Multifocal PSW	–	N/A	PB, VPA, none	None
II-3	F	52	17	20	Focal PSW	+	15 μV (Both sides)	VPA, LVT, L-Dopa	5 (Yearly)
III-1	M	28	N/A	17	Normal	–	–	VPA	None
III-7	M	23	23	22	Normal	Mild	–	OXCZ, CZP	3 partials

EEG electroencephalogram, GTC generalized tonic-clonic convulsions, SEP somatosensory evoked potentials, PSW polyspikes and waves, PB phenobarbital, VPA valproic acid, LVT levetiracetam, OXCZ oxcarbazepine, CZP clonazepam, N/A not available, – absence, + present.

All cases examined were from the same geographical region in the North of Spain.

Neuropsychological and electrophysiological studies

The Montreal cognitive assessment (MoCA), which assesses different cognitive domains (<http://www.mocatest.org/>), was used for the determination of cognitive dysfunction.

Electroencephalographies (EEGs) were obtained after the application of electrodes and conducting jelly, using the international 10–20 system of electrode placement. Standard techniques for nerve conduction studies were used. Peroneal and tibial motor responses and sural sensory responses were recorded. For somatosensory evoked potentials (SEPs), the median nerve at the wrist was stimulated, and upper limb SEPs were recorded at the contralateral scalp (C3' and C4'; 2 cm posterior to C3 and C4 on the international 10–20 system). Stimulation rate was 3 Hz, with duration of 0.2 ms. Digital averaging was performed using 200 samples; the filters were set at a high cut of 500 Hz and a low cut of 10 Hz. The latencies of the N20 and P25 peaks and the interpeak amplitudes of N20–P25 were analyzed. Averaging was typically performed three times to ensure reproducibility.

Surface electromyographies (EMGs) were recorded from wrist extensor and flexor muscles using surface electrodes placed over the muscle bellies 3 cm apart. The filters were set with a bandpass of 10Hz–1kHz. A triaxial accelerometer was placed over the first dorsal interosseous muscle of the hand.

C-reflexes were recorded from the abductor pollicis brevis muscle after delivering a supramaximal stimulus over median nerve in the wrist.

WES

WES was performed in three affected cases (I-5, II-3, and III-1; Fig. 1a). The SureSelect Human All exon 50 Mb exon-capture kit was used for library enrichment (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). The captured exome libraries were then sequenced on a HiSeq2000 according to the manufacturer's instructions for paired end 100-bp reads (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) and on a single-flow cell lane each to capture the maximum possible genetic variation. After sequencing, data were put through a computational pipeline for WES data processing and analysis following the general workflow adopted by the 1000 genomes project and analyzed as previously described [14].

Later, any potential mutation observed as common variation in the dbSNP137 or 1000 genomes project phase 1 was removed for further analyses. Genetic variants mapping to intragenic, intronic, and noncoding exonic regions, with the exception of those variants mapping close to splice sites, were also removed, since they are unlikely to be causative. Genetic

variants present in other public databases, such as the Exome Variant Server of the National Heart, Lung, and Blood Institute exome sequencing project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [15] and exomes generated in-house were also removed.

To assist in causative gene identification, the pathogenicity of each disease-segregating mutation was predicted by two computational methods previously evaluated as most efficient [16] (Fig. 1a, Table 2). The HomoloGene database from NCBI website was also used to examine the conservation of both disease-segregating mutations in different species (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).

Gene screening analyses

Genomic primers for PCR amplifications were designed using a primer design public website (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>). Primers were used to amplify *ACMSD* and *MYBBP1A* all coding exons and splice sites (Electronic supplementary material). PCR amplifications and sequencing reactions were performed and analyzed as previously described [14].

Results

Here, we report a family featuring a heterogeneous form of FCMTE. Clinical characteristics in affected members included seizures and postural hand tremor. Gait and postural disturbances that were levodopa responsiveness were also seen in one patient. Table 1 includes the main phenotypic characteristics of the four affected individuals fully examined by us (I-5, II-3, III-1, and III-7). More detailed clinical information about these four patients, three additional patients not examined by us (I-9, II-5, and II-8), and three neurologically unaffected family members, of which two (II-12 and II-13) have recently been examined by us, are described below. The clinical information of patients not examined by us was collected from medical records and communications with patients' relatives.

Patients' clinical details

Patient 1 (I-5) At the age of 17, he started suffering from myoclonic and generalized seizures that were rare and precipitated by sleep deprivation or alcohol intake. At 20 years of age, he also showed tremor of both hands. Seizures had good response to medications, but his tremor worsened considerably after treatment with valproate. At the age of 63, epileptic seizures disappeared, and the medication was discontinued. At the age of 73, he was cognitively normal and had no intolerance of light. He had postural tremor of both hands without any cerebellar, rigid-akinetic, or dystonic signs. EMG recorded in the arms showed 4–5 Hz frequency with co-contraction of agonists and antagonist muscles. Brain MRI

Table 2 Disease-segregating mutations identified through WES and subsequent analyses in a Spanish family featuring FCMTE

Gene	Chr	Nucleotide variation	Protein variation	Spanish control population (<i>n</i> =188)	Pathogenicity prediction (MutPred/SNPs&Go)	Expression	Associated disease
ACMSD	2q21.3	c.77G>A	p.W26X	Absent	Truncated protein	Kidney, liver, and brain	Epilepsy, Alzheimer, and Huntington
MYBBP1A	17p13.3	c.2758G>A	p.A920T	Absent	0.592/Neutral	Highly expressed	Tumor suppressor

Highlighted in bold is the disease-segregating mutation responsible for the FCMTE phenotype seen in our patients. Computational methods for pathogenicity prediction: MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>) and SNPs&GO (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>).

showed mild temporoparietal atrophy (data not shown). He died in 2011 due to a right temporal lobe hematoma.

Patient 2 (I-9) He suffered from epilepsy since childhood, but no history of tremor was collected. He also had diabetes and a chronic lung disease and died at the age of 63 from lung squamous carcinoma.

Patient 3 (II-3) This is a 53-year-old woman who suffered from postural tremor of both hands since the age of 17 and generalized convulsive seizures since the age of 20. Treatment with sodium valproate (2,000 mg/day) kept her in good seizure control but worsened her tremor. At the age of 49, she complained of a gait disorder. On examination, she showed hypomimia, mild gait and postural disturbance, orthostatic tremor, mild akinesia, and rigidity of neck and arms. A diagnosis of parkinsonism was made, and treatment with carbidopa-levodopa (300 mg/day) was given. The sodium valproate was later replaced by levetiracetam (2,000 mg/day), and she developed new seizures without improvement of parkinsonism. On her last neurological examination, she had high intolerance of light and wore sunglasses to avoid photosensitive myoclonic seizures. She had rhythmic involuntary movements in her upper and lower extremities, particularly induced by posture and action. The tremor of her hand became more severe with a postural component, and her leg tremor worsened during orthostatism, increasing her postural instability. Her gait was slow with short steps and hesitations during turns. Reflexes were brisk and plantar responses were flexor. Ocular movements and finger–nose–finger and heel-to-shin coordination tests were normal. She showed mild deficits in attention, memory, and executive function (MoCA score 19/30). Her EEG showed generalized spike and wave complexes more predominant in the left frontotemporal area. SEPs were giant with amplitude of 15 μ V in both sides. Bilateral C-reflexes were obtained in abductor pollicis brevis. Surface EMG showed a myoclonic tremor with irregular bursts of agonist and antagonist muscle co-contraction at a frequency of 4–6 Hz, which confirmed that the tremor was actually myoclonus, and showed periodic irregular muscle bursts with short burst duration of about 50 ms. Brain MRI showed mild cerebellar atrophy and high-intensity signals in T2 and

Flair-weighted images in ventral area of the brainstem and a bilateral linear hypointense images in inversion recovery sequences, suggesting a corticospinal tract Wallerian degeneration (Fig. 1d).

Patient 4 (II-5) This is a 55-year-old woman who presented with seizures in her teens and is now without treatment.

Patient 5 (II-8) This is a 54-year-old man who suffers from seizures and is now on treatment.

Patient 6 (III-1) This 28-year-old man had myoclonic and generalized seizures, properly controlled with sodium valproate (1,000 mg/day), since the age of 17. He had mild hand tremor but showed no signs of photosensitivity or gait disturbances. He was cognitively normal (MoCA 30/30). His neuropsychological evaluation showed normal EEG without photoparoxysmal response. SEP had normal amplitude (6 μ V). C-waves were not obtained, and surface EMG revealed an irregular tremor at 8–10 Hz with co-contraction of agonist and antagonist muscles of the forearm. His brain MRI was also normal.

Patient 7 (III-7) This is a 23-year-old man. Starting from age 22, he had several partial secondarily generalized convulsive seizures that are properly controlled with oxcarbazepine (1,200 mg/day) and clonazepam (1 mg/day). He has mild hand tremor that sometimes exacerbates without disabling him and feels some photosensitivity. He had a MoCA score of 30/30 and normal brain MRI. His EEG and SEP (2 μ V) were normal. C-waves were not obtained, and surface EMG revealed an irregular tremor at 8–10 Hz with co-contraction of agonist and antagonist muscles of the forearm.

Brief medical records for three additional family members were also available. For individual II-11, no history of tremor or epilepsy was recorded. Individual II-12 was reported to have gait disturbances and personality problems with intellectual disability but not tremor or epilepsy. Currently, she is not taking any medication and her last neurological examination revealed mild ataxia with areflexia in the legs and progressive distal sensory loss. She had a MoCA score of 25 and normal

EEG. Individual II-13 had one or two episodes of loss of consciousness at the age of 10, but at 45 years old, she is neurologically normal with a MoCA score of 30/30 and normal EEG.

WES

More than 85 % of the target exome was captured at 20-fold coverage or higher: 85.68 % for patient I-5, 85.36 % for patient II-3, and 89.15 % for patient III-1. After an adequate filtering of common genetic variation, 181 non-synonymous and 7 nonsense single nucleotide variants (SNVs) were identified for patient I-5, 209 non-synonymous and 7 nonsense SNVs for patient II-3, and 241 non-synonymous and 6 nonsense SNVs for patient III-1. Of these, only two, highly conserved among other species and absent in large number of control individuals ($n > 10,000$), including 188 ethnicity matched control chromosomes, were identified as disease-segregating mutations (Fig. 1a). These variants were both a G to A transition resulting in p.Trp26Stop and p.Ala920Thr, respectively. Only the p.Trp26Stop mutation, which lies in the *ACMSD* gene (MIM #608889) that encodes for the α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase, was predicted to be pathogenic (Table 2). *ACMSD* is an enzyme that is part of the kynurenine pathway of tryptophan degradation in mammals and reacts with α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde (ACMS) to produce α -aminomuconate- ϵ -semialdehyde. In the absence of *ACMSD*, ACMS is unstable and rapidly converts to quinolinate (quinolinic acid; QA), which is a potent excitotoxin thought to be involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as epilepsy, Alzheimer's disease, and Huntington's disease [17–20]. The p.Ala920Thr mutation is located in the *MYBBP1A* gene (MIM #604885); *MYBBP1A* encodes for MYB binding protein (P160) 1A, which acts as tumor suppressor and is essential for early embryonic development, controls cell cycle, and mitosis [21].

Based on the evidence that the kynurenine pathway has already been involved in the genesis of epileptic seizures [22], and alterations in the levels of the kynurenine pathway metabolites have been implicated in several neurological conditions, including Huntington's disease, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease [23], we concluded that the *ACMSD* mutation identified here is likely to be pathogenic and responsible for the cortical myoclonic tremor and epilepsy seen in our patients.

Later, due to the proximity of *ACMSD* to FCMTE2, the entire coding region and splice sites of *ACMSD* were examined in two families previously linked to this locus. Because tremor of both hands is a common feature of all our patients, these were also examined in 11 familial and 58 sporadic cases featuring ET. Sequencing data of 3' and 5' *ACMSD* untranslated

regions were also available and investigated in the 11 familial cases. And since genetic variants close to the *ACMSD* locus were previously associated with an increased risk for sporadic Parkinson's disease (PD) [24], the p.Trp26Stop mutation was also examined in 54 sporadic LOPD patients by direct Sanger sequencing. No additional mutation carrier was identified.

Discussion

We here report a large family featuring a heterogeneous form of FCMTE. All patients suffered from cortical myoclonic tremor, which could be misdiagnosed of ET in the first stages of the disease, and epilepsy. In one individual, the epilepsy disappeared in the adulthood. As the family described by Magnin and colleagues [25], one of our patient (II-3) also had gait disturbances, cognitive impairment, and photosensitivity that appeared during the disease progression and under treatment with valproate. The anomaly seen in the brain MRI of this patient (Fig. 1d) that may explain her variable phenotype has never been described in previously reported FCMTE families [26]. This patient was first diagnosed of L-dopa-responsive parkinsonism; however, the semiology of the gait disturbance, the type of tremor, and the remaining motor symptoms differ from the phenotype described in PD. For instance, her instability associated with the orthostatic tremor of the lower extremities has never seen in PD. Another relatively young patient (III-7) also felt some light sensitivity that might enhance with the disease progression. Although the mother (II-11) of this patient was not available for examination, given the AD pattern of inheritance of this family, she is an obligate carrier. Two of her sisters were also examined; however, none them developed epilepsy or tremor (Fig. 1a).

In order to identify the genetic causes underlying this disease in our family, WES was performed in three affected individuals of three different generations. This led us to identify two disease-segregating mutations in *ACMSD* and *MYBBP1A* genes, respectively (Table 2). Both mutations (Trp26Stop and p.Ala920Thr) were absent in large number of control chromosomes, including ethnicity matched controls, but only the mutation in *ACMSD*, p.Trp26Stop, which causes a premature stop codon and is conserved among other orthologs, was predicted to be pathogenic (Fig. 1b, c). The fact that only one family was identified with mutations in this gene is not surprising, as almost each FCMTE family maps to a different locus. The absence of pathogenic mutations in two families previously linked to FCMTE2 also suggests that *ACMSD* is not responsible for the FCMTE2 phenotype, and the FCMTE2 gene remains to be discovered. While it is also possible that the *ACMSD* disease-segregating mutation that causes a truncated protein may be a very rare benign variant, the already known involvement of kynurenines in the genesis of epileptic seizures in mice, frogs, and rats further supports its pathogenicity [20].

Even though we were unable to identify any ET or LOPD patient with mutations in *ACMSD*, the presence of tremor in all our patients and the observation of parkinsonism in one of them support the possibility that the nigrostriatal dopaminergic system may also be vulnerable to *ACMSD* mutation, as suggested by previously published GWAS studies [24]. However, this should be interpreted with caution, since only one of our patients presents with parkinsonism; the PD-associated SNPs lie outside the *ACMSD* locus, and this association, which showed moderate evidence of heterogeneity across populations [24], has not been replicated by all PD-associated GWAS studies [27].

The association of *ACMSD* mutation with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism is very interesting. Human *ACMSD*, predicted to be a cytosolic enzyme, is expressed at very low but significant levels in the brain [28]. *ACMSD* is part of the kynurenine pathway, which is the main route of tryptophan metabolism. Many kynurenines, including quinolinate, which levels increase at *ACMSD* deficiency, cannot cross the blood–brain barrier, or do very poorly, and as such must be formed locally within the brain [12], suggesting that the regulation of quinolinate is brain specific. While we were unable to examine the brain-specific *ACMSD* in our patients, the *ACMSD* expression levels have already been shown to be highly correlated to the enzyme activity levels [28], suggesting that the *ACMSD* mutation identified in our patients probably results in a significant decrease of its enzymatic activity. It has additionally been shown that the inhibition of *ACMSD* blocks the conversion of tryptophan to picolinic acid, which results in cellular QA accumulation (Fig. 2) [29], and that intracerebroventricular injection of QA causes seizure activity in mice [18]. Taken together, we hypothesize that the *ACMSD* p.Trp26Stop mutation may result in a significant increase of the cellular QA levels in the brain, probably due to impairments in its enzymatic activity, leading to the initiation and propagation of seizures. These QA-induced seizures have been shown to be associated with increased levels of extracellular KYNA, suggesting that high KYNA levels arise as a response to the seizure activity and are therefore neuroprotectives [20, 30].

In addition, the involvement of abnormal serotonin transmission in the generation of seizures and myoclonus has been discussed for a long time. In particular, previous research has demonstrated a reduction of tryptophan and other serotonin metabolites in animals and patients with PME as well as cerebrospinal fluid of patients with cortical myoclonus; recent data also support the implication of altered tryptophan metabolism in the pathogenesis of Unverricht–Lundborg disease [31, 32]; and both 5-hydroxy-L-tryptophan and alpha-lactalbumin have already been used for the treatment of myoclonus [33, 34].

In conclusion, despite that further studies are warranted to elucidate the molecular mechanisms by which *ACMSD*

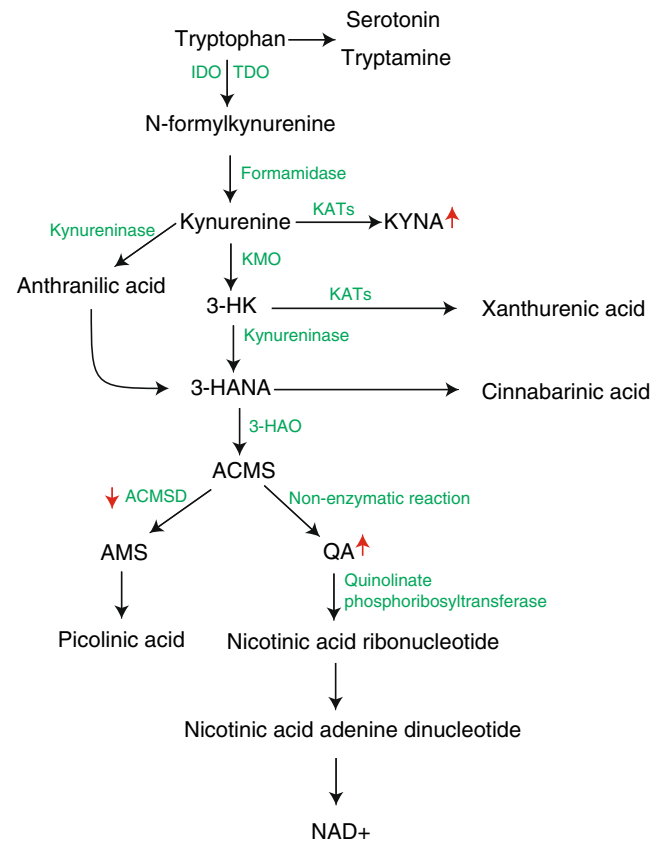


Fig. 2 Diagram of the kynurenine pathway of tryptophan degradation in mammals [12, 35]. In red is highlighted what is believed to occur in the presence of *ACMSD* deficiency. KYNA levels are elevated in response to seizure activity. *IDO* indoleamine 2,3-dioxygenase, *TDO* tryptophan 2,3-dioxygenase, *KYNA* kynurenine acid, *KATs* kynurenine aminotransferases, *3-HK* 3-hydroxykynurenine, *3-HANA* 3-hydroxyanthranilic acid, *3-HAO* 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase, *ACMSD* α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase, *ACMS* α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde, *AMS* α -aminomuconate- ϵ -semialdehyde, *QA* quinolinic acid (quinolinate)

mutation may cause cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism, we conclude that the disease-segregating *ACMSD* p.Trp26Stop mutation is likely to be responsible for the FCMTE phenotype seen in our patients. This finding supports the evidence that cellular changes in the metabolites of the kynurenine pathway are implicated in neurodegeneration [12, 23] and suggests that both brain-specific KYNA deficiency and QA accumulation may also be important factors in the pathogenesis of cortical myoclonic tremor and epilepsy. Ultimately, the kynurenine pathway is likely to be a potential drug target for treating these and other devastating neurodegenerative disorders [35].

Acknowledgments We thank the patients and their families for participating in this study. This work is supported in part by the “Instituto de Salud Carlos III” (FIS P110/02714; JFMM) and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke of the National Institute of Health under award number R21NS082881 to CPR.

Conflict of interest All authors declare they have no competing interest.

References

- van Rootselaar AF, van Schaik IN, van den Maagdenberg AM, Koelman JH, Callenbach PM, Tijssen MA (2005) Familial cortical myoclonic tremor with epilepsy: a single syndromic classification for a group of pedigrees bearing common features. *Mov Disord* 20:665–673
- Mikami M, Yasuda T, Terao A, Nakamura M, Ueno S, Tanabe H, Tanaka T, Onuma T, Goto Y, Kaneko S et al (1999) Localization of a gene for benign adult familial myoclonic epilepsy to chromosome 8q23.3-q24.1. *Am J Hum Genet* 65:745–751
- Depienne C, Magnin E, Bouteiller D, Stevanin G, Saint-Martin C, Vidailhet M, Apartis E, Hirsch E, LeGuern E, Labauge P et al (2010) Familial cortical myoclonic tremor with epilepsy: the third locus (FCMTE3) maps to 5p. *Neurology* 74:2000–2003
- de Falco FA, Striano P, de Falco A, Striano S, Santangelo R, Perretti A, Balbi P, Cecconi M, Zara F (2003) Benign adult familial myoclonic epilepsy: genetic heterogeneity and allelism with ADCME. *Neurology* 60:1381–1385
- Striano P, Chifari R, Striano S, de Fusco M, Elia M, Guerrini R, Casari G, Canevini MP (2004) A new benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) pedigree suggesting linkage to chromosome 2p11.1-q12.2. *Epilepsia* 45:190–192
- Saint-Martin C, Bouteiller D, Stevanin G, Popescu C, Charon C, Ruberg M, Baulac S, LeGuern E, Labauge P, Depienne C (2008) Refinement of the 2p11.1-q12.2 locus responsible for cortical tremor associated with epilepsy and exclusion of candidate genes. *Neurogenetics* 9:69–71
- Crompton DE, Sadleir LG, Bromhead CJ, Bahlo M, Bellows ST, Arsov T, Hartly R, Lawrence KM, Dunne JW, Berkovic SF et al (2012) Familial adult myoclonic epilepsy: recognition of mild phenotypes and refinement of the 2q locus. *Arch Neurol* 69:474–481
- Carr JA, van der Walt PE, Nakayama J, Fu YH, Corfield V, Brink P, Ptacek L (2007) FAME 3: a novel form of progressive myoclonus and epilepsy. *Neurology* 68:1382–1389
- Yeetong P, Ausavarat S, Bhidayasiri R, Piravej K, Pasuthamchat N, Desudchit T, Chunharas C, Loplumlert J, Limotai C, Suphapeetiporn K et al (2013) A newly identified locus for benign adult familial myoclonic epilepsy on chromosome 3q26.32–3q28. *Eur J Hum Genet* 21:225–228
- Merner ND, Girard SL, Catoire H, Bourassa CV, Belzil VV, Riviere JB, Hince P, Levert A, Dionne-Laporte A, Spiegelman D et al (2012) Exome sequencing identifies FUS mutations as a cause of essential tremor. *Am J Hum Genet* 91:313–319
- Krebs CE, Paisan-Ruiz C (2012) The use of next-generation sequencing in movement disorders. *Front Genet* 3:75
- Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ (2012) Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci* 13:465–477
- Stone TW, Darlington LG (2002) Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1:609–620
- Karkheiran S, Krebs CE, Makarov V, Nilipour Y, Hubert B, Darvish H, Frucht S, Shahidi GA, Buxbaum JD, Paisan-Ruiz C (2013) Identification of COL6A2 mutations in progressive myoclonus epilepsy syndrome. *Hum Genet* 132:275–283
- Exome Variant Server (2012) NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evsg.washington.edu/EVS/>) [06/2013]
- Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M (2011) Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat* 32:358–368
- Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R (2004) Neostriatal and cortical quinolinic levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 17:455–461
- Lapin IP (1978) Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm* 42:37–43
- Rahman A, Ting K, Cullen KM, Braidy N, Brew BJ, Guillemain GJ (2009) The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons. *PLoS One* 4:e6344
- Wu HQ, Schwarcz R (1996) Seizure activity causes elevation of endogenous extracellular kynurenic acid in the rat brain. *Brain Res Bull* 39:155–162
- Mori S, Bernardi R, Laurent A, Resnati M, Crippa A, Gabrieli A, Keough R, Gonda TJ, Blasi F (2012) Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) is essential for early embryonic development, controls cell cycle and mitosis, and acts as a tumor suppressor. *PLoS One* 7:e39723
- Lapin IP (1981) Kynurenines and seizures. *Epilepsia* 22:257–265
- Amaral M, Outeiro TF, Scrutton NS, Giorgini F (2013) The causative role and therapeutic potential of the kynurenine pathway in neurodegenerative disease. *J Mol Med (Berl)* 91:705–713
- Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simon-Sanchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjornsdottir S et al (2011) Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377:641–649
- Magnin E, Vidailhet M, Ryff I, Ferreira S, Labauge P, Rumbach L (2012) Fronto-striatal dysfunction in type 3 familial cortical myoclonic tremor epilepsy occurring during aging. *J Neurol* 259:2714–2719
- Sharifi S, Aronica E, Koelman JH, Tijssen MA, Van Rootselaar AF (2012) Familial cortical myoclonic tremor with epilepsy and cerebellar changes: description of a new pathology case and review of the literature. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 2:472–482
- Liu X, Cheng R, Verbitsky M, Kisselev S, Browne A, Mejia-Sanatanana H, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Waters C et al (2011) Genome-wide association study identifies candidate genes for Parkinson's disease in an Ashkenazi Jewish population. *BMC Med Genet* 12:104
- Fukuoka S, Ishiguro K, Yanagihara K, Tanabe A, Egashira Y, Sanada H, Shibata K (2002) Identification and expression of a cDNA encoding human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD). A key enzyme for the tryptophan-niacin pathway and “quinolinic hypothesis”. *J Biol Chem* 277:35162–35167
- Fukuwatari T, Ohsaki S, Fukuoka S, Sasaki R, Shibata K (2004) Phthalate esters enhance quinolinic production by inhibiting alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD), a key enzyme of the tryptophan pathway. *Toxicol Sci* 81:302–308
- Schwarcz R, Speciale C, French ED (1987) Hippocampal kynurenines as etiological factors in seizure disorders. *Pol J Pharmacol Pharm* 39:485–494
- Arbatova J, D'Amato E, Vaarmann A, Zharkovsky A, Reeben M (2005) Reduced serotonin and 3-hydroxyanthranilic acid levels in serum of cystatin B-deficient mice: a model system for progressive myoclonus epilepsy. *Epilepsia* 46(Suppl 5):49–51
- Striano P, D'Amato E, Pezzella M, Mainardi P, Zara F, Striano S (2010) Sudden death in Unverricht–Lundborg patients: is serotonin the key? *Neurol Sci* 31:115–116
- Errichiello L, Pezzella M, Santulli L, Striano S, Zara F, Minetti C, Mainardi P, Striano P (2011) A proof-of-concept trial of the whey protein alfa-lactalbumin in chronic cortical myoclonus. *Mov Disord* 26:2573–2575
- Pranzatelli MR, Tate E, Galvan I, Wheeler A (1996) A controlled trial of 5-hydroxy-L-tryptophan for ataxia in progressive myoclonus epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg* 98:161–164
- Vecsei L, Szalardy L, Fulop F, Toldi J (2013) Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov* 12:64–82

10.3 Trabajo 3.

***SORT1* Mutation Resulting in Sortilin Deficiency and p75NTR Upregulation in a Family with Essential Tremor**

Elena Sánchez, Alberto Bergareche, Catharine E. Krebs, Ana Gorostidi, Vladimir Makarov, Javier Ruiz-Martínez, Alejo Chorny, Adolfo López de Munain, José Félix Marti-Masso, Coro Paisán-Ruiz.

ASN Neuro. 2015 Aug 21; 7(4)

La mutación *SORT1* p. G171A descrita en una familia con temblor esencial produce deficiencia de sortilina y altos niveles de p75NTR

El temblor esencial (TE) es el trastorno del movimiento más frecuente afectando a millones de personas en los Estados Unidos. A pesar de que la existencia de una historia familiar positiva es uno de los más importantes factores de riesgo para el TE, las causas genéticas del TE siguen siendo desconocidas. En este estudio, se ha realizado una secuenciación de todo el exoma y las subsecuentes aproximaciones en una familia con una forma autosómica dominante de TE de inicio temprano. También se han realizado análisis funcionales incluyendo estudios de mutagénesis, cultivo celular, expresión genética y análisis inmunoenzimáticos y de apoptosis. Se ha identificado una mutación (p.Gly171Ala) que segrega con la enfermedad en el gen *SORT1*, que está ausente en la población normal. La mutación p.Gly171A ha demostrado que no sólo altera la expresión de la proteína que codifica (sortilina) sino también los niveles de RNAm de su receptor, neurotrofina p75, que se sabe que están implicados en la lesión traumática cerebral, apoptosis neuronal, y la neurotransmisión.

***SORT1* Mutation Resulting in Sortilin Deficiency and p75^{NTR} Upregulation in a Family With Essential Tremor**

ASN Neuro
July-August 2015: 1–13
© The Author(s) 2015
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1759091415598290
asn.sagepub.com



Elena Sánchez¹, Alberto Bergareche^{2,3,4}, Catharine E. Krebs¹, Ana Gorostidi^{2,3,4}, Vladimir Makarov⁵, Javier Ruiz-Martinez^{2,3,4}, Alejo Chorny⁶, Adolfo Lopez de Munain^{2,3,4,7}, Jose Felix Marti-Masso^{2,3,4,7,*}, and Coro Paisán-Ruiz^{1,8,9,*}

Abstract

Essential tremor (ET) is the most prevalent movement disorder affecting millions of people in the United States. Although a positive family history is one of the most important risk factors for ET, the genetic causes of ET remain unknown. In this study, whole exome sequencing and subsequent approaches were performed in a family with an autosomal dominant form of early-onset ET. Functional analyses including mutagenesis, cell culture, gene expression, enzyme-linked immunosorbent, and apoptosis assays were also performed. A disease-segregating mutation (p.Gly171Ala), absent in normal population, was identified in the *SORT1* gene. The p.Gly171Ala mutation was shown not only to impair the expression of its encoding protein sortilin but also the mRNA levels of its binding partner p75 neurotrophin receptor that is known to be implicated in brain injury, neuronal apoptosis, and neurotransmission.

Keywords

SORT1 mutation, tremor, sortilin downregulation, p75^{NTR} upregulation

Introduction

Essential tremor (ET) is one of the most common neurological disorders among adults whose incidence increases with age. Albeit its core motor symptom is an 8- to 12-Hz kinetic tremor of the arms, some patients with ET also develop other motor and non-motor manifestations, including parkinsonism, myoclonus, dystonia, cerebellar dysfunction, sensory abnormalities, sleep disorders, and cognitive and psychiatric features (Louis, 2010). Despite many magnetic resonance imaging (MRI) studies have supported the hypothesis that the abnormalities of the cerebellothalamo-cortical motor pathway and the fronto-parietal circuit are involved in the functional pathological changes of ET (Bagepally et al., 2012), there is still a controversy as to whether there is an underlying neurodegenerative process of the cerebellum in ET (Buijink et al., 2013; Symanski et al., 2014). Consequently, there is growing evidence that ET may

¹Department of Neurology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

²Biodonostia Research Institute, University of the Basque Country, San Sebastián, Gipuzkoa, Spain

³Department of Neurology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Guipuzcoa, Spain

⁴Centro de investigación biomédica en Red para enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

⁵Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

⁶Department of Medicine, The Immunology Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

⁷Department of Neurosciences, University of the Basque Country, San Sebastián, Guipuzcoa, Spain

⁸Departments of Psychiatry and Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

⁹Friedman Brain and Mindich Child Health and Development Institutes, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding Author:

Coro Paisán-Ruiz, Department of Neurology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA.
Email: coro.paisan-ruiz@mssm.edu



not be a single disease but rather a family of diseases (Benito-Leon, 2014).

Although familial aggregation has been long reported in ET, with 50% to 70% of patients having a familial form of ET, and a positive family history being one of the most important risk factors for ET (Louis et al., 2001), the genetic basis of ET remains elusive. This is partly due to misdiagnosis, a common feature in ET, with 37% to 50% of ET patients reported to be misdiagnosed (Schrage et al., 2000). Genetic variants within *LINGO1* (MIM #609791), *DRD3* (MIM #126451), and *HSL-BP3* (MIM #609359) genes have been reported to have susceptibility for developing ET; however, these associations have not been consistently replicated (Zimprich, 2011; Kuhlbaumer et al., 2014). Through genome-wide association and whole exome sequencing (WES) analyses, *SLC1A2* (MIM #600300) and *FUS* (MIM #137070) genes have been reported to respectively carry susceptibility or causative alleles for ET (Merner et al., 2012; Thier et al., 2012). While the disease-associated mutation identified in the *FUS* gene was only present in 54% of individuals classified as “possible” ET, it fully segregated with disease in individuals with definite and probable ET (Merner et al., 2012). More recently, a disease-segregating mutation (p.G399S) in the *HTRA2* gene has been reported in a large kindred featuring both ET and Parkinson’s disease (Unal Gulsuner et al., 2014). Taken together, these clinical barriers associated with ET make traditional gene discovery approaches not succeed in the identification of the causal gene defect. Therefore, in an attempt to identify a causative gene for ET, we performed WES and subsequent functional analyses in a family featuring an autosomal dominant form of early-onset ET.

Materials and Methods

Subjects

A Spanish ET family consisting of an affected father, an unaffected paternal aunt, a healthy mother as well as one affected and two unaffected siblings was clinically examined and subject to WES approaches (Figure 1(a)). Subjects were recruited from a descriptive study of familial and sporadic ET cases and controls carried out in the Movement Disorders Unit at the Donostia University Hospital (San Sebastian, Spain). Genomic DNA samples from all family members in addition to samples from another 28 familial and 62 sporadic ET cases ($n=90$) were available for study. A cohort composed of 188 control chromosomes of Spanish individuals without family history of any movement disorders was also available. The age at sample collection of the control cohort ranged from 60 to 93 years with an average of 69.1 years. The local ethics committee at the Donostia University Hospital approved this study and informed

consent was obtained from all participants. DNA samples from all participating members were isolated from whole blood using standard procedures. All methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

Clinical Examination

All participants in this study underwent a series of structured questionnaires and a comprehensive neurological and neuropsychological assessment undertaken at the Movement Disorders Unit by three experienced movement disorder specialists (JFM-M, JRM, and AB). The following standardized protocol was used: (a) demographic variables; (b) personal and family history and general medical health (Cumulative Illness Rating Scale score [range: 0–42], total number of prescription medications); (c) neurological assessment: a subjective motor complaints questionnaire, the Activities-specific Balance Confidence scale, a motor examination including UPDRS part III and a general examination in order to detect dystonia, myoclonus, ataxia, and polyneuropathy as well as a specific tremor exploration that includes one test for postural tremor and five for kinetic tremor; (d) the use of medication (yes vs. no); (e) additional variables of interest (e.g., age of symptom onset); (f) the SCOPA-AUT assessment of autonomic dysfunction (Visser et al., 2004); and (g) the Pittsburgh sleep quality index (Buysse et al., 1989). The Montreal Cognitive Assessment (MoCA) that assesses different cognitive domains (<http://www.mocatest.org/>) was used to determine possible cognitive dysfunction and DSM-IV criteria were used for diagnosis of depression and anxiety disorders (American Psychiatric Association, 1994). In addition to the standard clinical exploration described above, evaluation of ET was carried out by recording the drawing of an “Archimedes spiral” (Elble et al., 1990) and using the Fahn–Tolosa–Marin tremor rating scale (TRS; Fahn et al., 2003). Surface electromyography (EMG) was recorded from wrist extensor and flexor muscles using surface electrodes placed over the muscle bellies 3 cm apart. The filters were set with a band-pass of 10 Hz to 1 kHz. A triaxial accelerometer was placed over the first dorsal interosseus muscle of the hand. In an effort to minimize diagnostic pitfalls, clinical criteria were comprehensively reviewed by the Consensus Statement of the Movement Disorder Society on Tremor (Deuschl et al., 1998) and the Washington Heights–Inwood Genetic Study of Essential Tremor criteria (Louis et al., 1997; Benito-Leon and Louis, 2006). Each patient received a diagnosis of ET from a movement disorders neurologist after the first evaluation which subsequently was confirmed by consensus with the rest of the team based on the review of the clinical data and electrophysiological records from the second evaluation using the formerly described diagnostic criteria. Criteria for

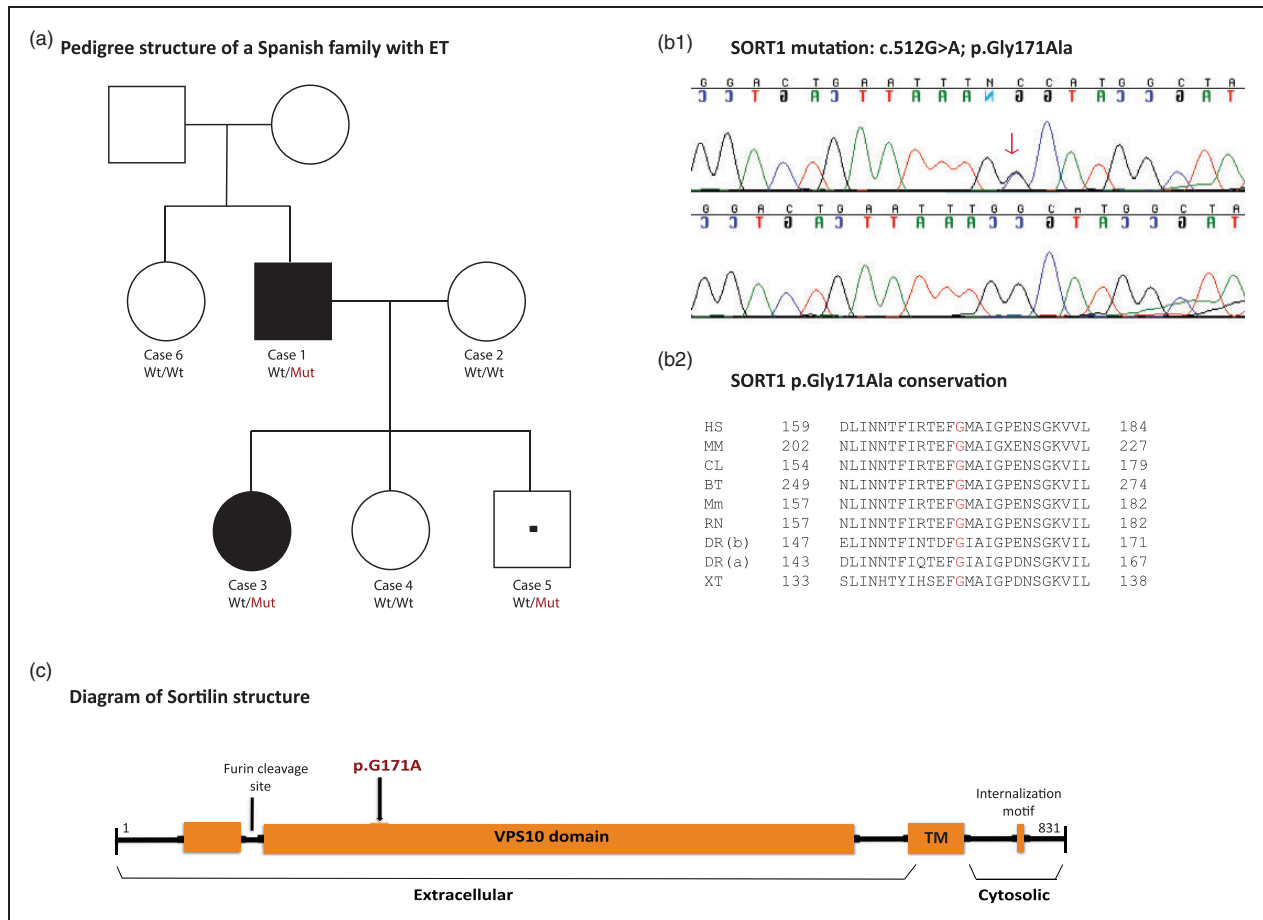


Figure 1. Pedigree structure of a Spanish family with ET identified with a pathogenic SORT1 mutation. (a): Definitive affected cases are represented with black filled square (male) and circle (female) and a dot inside a square represents an individual male at risk. Wt/Mut indicates heterozygous carrier for the mutant allele while Wt/Wt indicates noncarrier. (b1): Sanger chromatograms of the human reference sequence (bottom) and heterozygous mutant sequence (top) with a red arrow highlighting the pathogenic mutation. (b2): The conservation of the p.G171A mutation among other orthologous is shown. HS: H. Sapiens; MM: M. Mulatta; CL: C. Lupus; BT: B. Taurus; Mm: M. musculus; RN: R. Norvegicus; DR: D. Rerio; XT: X. Tropicalis. (c): Diagram of sortilin structure. All protein domains are shown. TM: Transmembrane domain.

definitive ET included abnormal bilateral postural or kinetic tremor of the hands in the absence of other neurological symptoms.

WES Approaches

Four DNA samples from two affected (Cases 1 and 3) and two unaffected cases (Cases 2 and 4) were subject to WES analyses (Figure 1(a)). The SureSelect Human All exon 50 Mb exon-capture kit was used for library enrichment (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) and captured libraries were sequenced on the HiSeq2000 according to the manufacturer's instructions for paired-end 100-bp reads (Illumina Inc, San Diego, CA), using a single flow cell lane per sample. Sequencing data were put through a computational pipeline for WES data processing and analysis following the general workflow adopted

by the 1000 genomes project (DePristo et al., 2011) and as described elsewhere (Marti-Masso et al., 2013). Each exome's statistics were conducted in PICARD (<http://picard.sourceforge.net/>).

Filtering of Common Genetic Variation

Any potential mutation observed as common variation (frequency > 5%) in the latest dbSNP137 build, 1000 Genomes Project Phase 1, other public databases, such as the Exome Variant Server of the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>; Exome Variant Server, 2015), or exomes generated in house (Marti-Masso et al., 2013) was removed from further analyses. Only genetic variants mapping to coding and splice site regions were considered causative.

Prediction of Mutation Pathogenicity

The pathogenicity of each novel disease-segregating mutation was predicted by four computational methods: MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>), SNPs&Go (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>), Mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>), and SIFT (<http://sift.jevl.org/>). The NCBI HomoloGene database was used to examine the conservation of novel SNVs identified in different species (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>). The professional Human Gene Mutation Database (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php>) and the NCBI ClinVar database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) were used to determine if novel single nucleotide variations (SNVs) were already known to be associated with disease-related phenotypes.

Gene Screening Analyses

Genomic primers for Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifications of the entire coding region and intron–exon boundaries of *SORT1*, *LAPTM5* exon 5, and *GRIN2D* exon 13 were designed using a primer design public website (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>; primer sequences available upon request). All purified PCR products were sequenced in both forward and reverse directions by Sanger sequencing using Applied Biosystems BigDye terminator v3.1 sequencing chemistry as per the manufacturer's instructions and analyzed as described elsewhere (Marti-Masso et al., 2013).

Mutagenesis and Cell-Culture Assays

Human embryonic kidney cells HEK293 were cultured in Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. The *SORT1* p.Gly171Ala (p.G171A) mutation was introduced into the human pCMV6-XL5-*SORT1* wild-type plasmid (Origene, Rockville, MD) by site-directed mutagenesis (QuikChangeII, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). All generated constructs were verified in both directions by Sanger sequencing and using the human sequence GRCh37.p13 as a reference.

HEK293 cells were grown in 96-well and 12-well tissue culture plates. After reaching confluency (~80%), cells were transiently transfected using FuGene 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, WI) with 0.1 μ g of either pCMV6-XL5-*SORT1* wild-type or mutant human plasmids. After 24 hr, culture media was replaced and cells were treated independently with 10 ng/ml or 30 ng/ml of two different pro-neurotrophics factors: pro-nerve growth factor (proNGF) and pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF), or with a combination of both of them (Novoprotein, Summit, NJ).

Cells were then incubated at 37°C for 72 hr except for apoptosis assays in which a 16 h incubation was used. Conditioned media was collected and cells were harvested.

Gene Expression Analyses

RNA extraction from HEK293 cells was performed using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as per manufacturer's instructions. Extracted RNA was transcribed into cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Grand Island, NY). Gene expression was carried out by qPCR using an Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA), SYBRGreen PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the following oligonucleotide sequences: *SORT1*-F 5'-GGGGACACATGGAGCATGG-3' and *SORT1*-R 5'-GGAATAGACAATGCCTC GATCAT-3' for *SORT1* expression, *B2M*F1-F 5'-GGC CGAGATGTCTCGCTCCG-3' and *B2M*R1 5'-TTGGA GTACGCTGGATAGCCTCC-3' for *B2M*, and *p75*-F 5'-CCTACGGCTACTACCAGGATG-3' and *p75*-R 5'-CACACGGTGTCTGCTTGT-3' for *p75*^{NTR}. Samples were run in triplicates, analyzed using the standard curve method, and normalized to *B2M* housekeeping gene using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Immunoblot Analyses

Lysates from cells were prepared in radioactive immunoprecipitation assay buffer and treated with protease inhibitor cocktail. Equal amounts of proteins were added to Laemmli's buffer (Bio-Rad, Hercules, CA), heated for 5 min at 95°C, and loaded into a 15-wells 4% to 12% Bis-Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA). Proteins were then transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA), blocked with 5% nonfat dry milk in Phosphate Buffered Saline with Tween-20 (PBST), and incubated with primary antibody anti-*SORT1* (1 μ g/ml; Abcam, Cambridge, MA; ab16640) and secondary antibody anti-Rabbit conjugated to horseradish peroxidase (1:5,000; Abcam; ab6721). Anti-GAPDH antibody (1:5000, Trevigen, Gaithersburg, MD) was used as loading control. Protein expression was detected by using Lumina Forte (Millipore, Billerica, MA), gel images were obtained using a G:BOX Chemi image analyzer (Syngene, Frederick, MD), and densitometric analyses were performed through the ImageJ software (imagej.nih.gov).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Human progranulin (hPGRN) in conditioned medium from wild-type and mutant HEK-293 cells was detected using the DuoSet ELISA Development System kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) following the

manufacturer's protocol. The hPGRN from five human samples (Cases 2–6; Figure 1(a)) was measured using the hPGRN ELISA kit from Adipogen (San Diego, CA). Absorbance values were measured using a M5 multimodal plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at wavelengths of 450 nm and 560 nm.

Apoptosis Assay by Flow Cytometry Analysis

Quantitative analysis of apoptotic cell death was done using the Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). HEK293 cells were treated with 30 ng/ml of proneurotrophins (proNTs) for 16 hr; cells were then harvested, stained with Alexa Fluor® 488-Annexin V and PI in annexin-binding buffer, and analyzed by flow cytometry using a BD LSR II flow cytometer and the BD FACSDiva software (BD Bioscience, San Jose, CA). Cells stained with only Annexin V were considered as being in early apoptosis, while cells stained with both Annexin V and PI were considered to be in late apoptosis or necrotic stage. HEK293 cells treated with 2 mM of hydrogen peroxide were used as positive control for apoptosis. Data analysis was performed using the FlowJo software version 9.3.2 (TreeStar, Ashland, OR).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software version 6.00 (GraphPad, La Jolla, CA). Data on graphs are presented as mean \pm SEM. Statistical differences between wild-type and mutant were calculated by using the Mann-Whitney nonparametric *U* test. For *SORT1* mRNA expression using different proNT concentrations, statistical significance was determined using a linear regression model. Values of $p \leq .0001$ were considered highly significant (****).

Results

Phenotypic Examination of a Spanish Family With ET

The reported ET family, who consisted of two “definitive” affected individuals as well as four unaffected members (Figure 1(a)), featured postural tremor of both hands with slow progression since childhood. Psychiatric features, such as depression and anxiety, were found in one unaffected member. Detailed clinical descriptions of all family members examined are described below.

Case 1. This is an affected male who was first seen in 2006 with postural and action tremor of both hands and without voice, head, or rest tremors. He reported to have tremor with slow progression since childhood. No other signs of motor impairment suggestive of parkinsonism, myoclonus,

dystonia, ataxia, and polyneuropathy were identified, and he did not show any sign of autonomic involvement, sleep disorder (insomnia, drowsiness, REM sleep behavior disorder (RBD)), anxiety, or depression. He did not take any medication for tremor, but his tremor improved with alcohol intake. He reported hypercholesterolemia and had a myocardial infarction in 2000 and an atherothrombotic left pontine infarction in 2001. In 2008, he died of head injury with a left subdural hematoma and intracranial fronto-temporal hemorrhage at 73 years of age. He scored 36 in the TRS scale and had a MoCA value of 27/30 (normal value > 25). His drawing of right hand spiral is shown in Figure 2(a).

Case 2. This is the wife of case 1 who did not show any sign of tremor or other neurological symptoms.

Case 3. This is a 48-year-old woman who suffers from tremor of both hands since childhood. During examination, she showed symmetric postural tremor involving hands without resting or action tremors and without affecting head, voice, and trunk. Her gait was normal and no clinical signs of parkinsonism, myoclonus, dystonia, ataxia, and polyneuropathy were found. She did not present any sign of autonomic involvement, sleep disorder (insomnia, drowsiness, RBD), anxiety, or depression. She scored 11 in the TRS scale and showed normal cognitive status with a MoCA value of 30/30 and a normal brain MRI. EMG recorded a postural tremor of 9.5 Hz of frequency and 46 mV of amplitude. Her total cholesterol was 244 mg/dl and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels were slightly elevated (176 mg/dl). Her drawing of right hand spiral is shown in Figure 2(b).

Case 4. This is a 46-year-old woman who reported having mild tremor of both hands during her childhood when she was a regular tobacco smoker, but it greatly improved after smoking withdrawal. On a recent examination, she showed no tremor and a normal cognitive status (MoCA = 30/30). Her brain MRI, total cholesterol, and LDL levels were normal.

Case 5. This is a 43-year-old man who apparently has not reported tremor or an EMG-recorded tremor. His brain MRI was normal and showed a MoCA value of 30/30. He has high levels of total cholesterol and LDL and is under treatment with atorvastatine 20 mg/day.

Case 6. This is 67-year-old woman who has had anxiety and depression symptoms for 15 years and is being treated with 20 mg/day of paroxetine. On examination, she showed no tremor and her cognitive assessments (MoCA = 30/30) and LDL levels were normal.

None of the unaffected cases (Cases 4, 5, 6) showed any sign of motor involvement suggestive of parkinsonism, myoclonus, dystonia, ataxia, and polyneuropathy, nor nonmotor symptoms such as autonomic involvement, sleep disorders, anxiety, or depression.

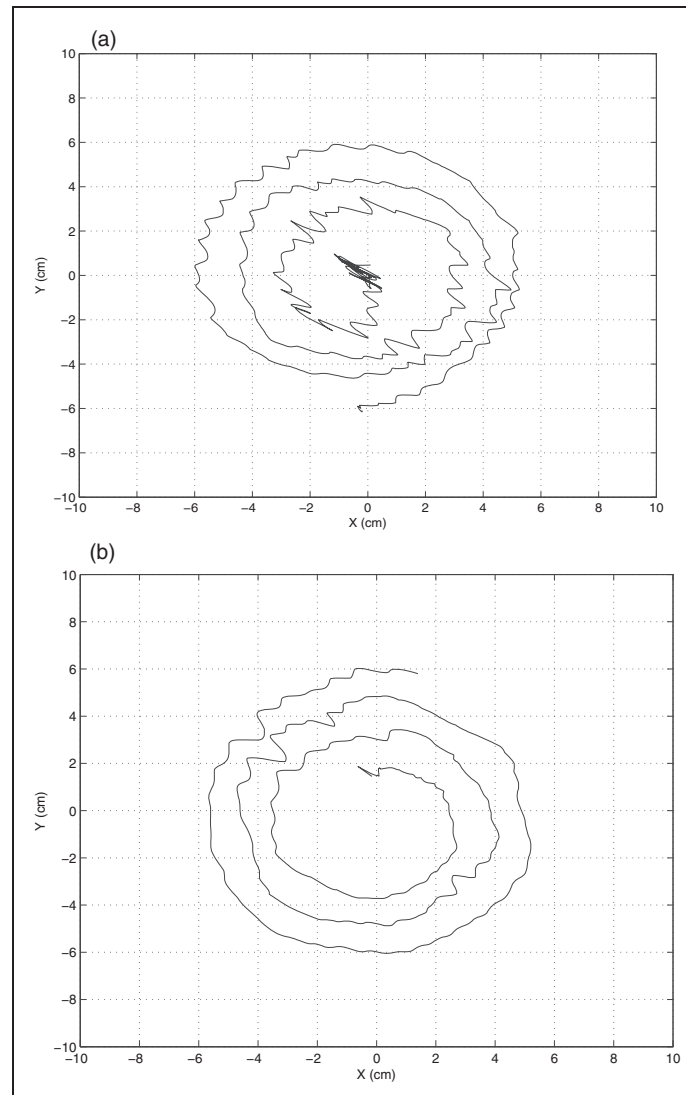


Figure 2. Archimedes spirals. Right hand spirals of affected Case 1 (a) and Case 3 (b) are shown. Archimedes spirals were drawn on a digitizing tablet.

WES and Subsequent Analyses

WES approaches performed in four family members captured between 91.33% (Case 1) and 88.30% (Case 2) of the target exome at 20-fold coverage or higher. Approximately 1,000 novel, coding SNVs, including only missense and nonsense genetic variants, were identified in each family member sequenced: 1062 SNVs were identified for Case 3, 1,024 for Case 1, 1,006 for Case 2, and 884 for Case 4. After adequate filtering and by keeping SNVs only shared by both affected individuals, we were left with six SNVs as potential disease-associated mutations. Two of these were not validated through Sanger sequencing and the other four were also present in the youngest family member (Case 5), who is apparently unaffected at his 43 years of age. Because the

existence of a variable age at onset is common in families with tremor, every unaffected individual younger than 50 years should still be considered at risk (Merner et al., 2012). All four novel SNVs were then tested in 188 ethnicity-matched normal chromosomes, but only one was found present in the control population. A DNA sample from an additional unaffected member (Case 6) was then acquired and tested for these three novel SNVs; she was found to be a noncarrier for any of them. By using four different computational programs, only two SNVs were predicted to be deleterious by all programs. Although one of this (p.Gly171Ala) was reported with very low frequency ($5.769E-05$) in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) that contains exome data for a variety of rare diseases including rare neuromuscular diseases (ExAC, 2015), none of them were reported in the

European population. These two SNVs were also highly conserved across different species while the other one reported in European population (ExAC data) and situated in the *GRIN2D* gene, which encodes a class of ionotropic glutamate receptor and has been associated with schizophrenia susceptibility in the Japanese population (Makino et al., 2005), was not. The two pathogenic-predicted, highly conserved SNVs were located within *LAPTM5* and *SORT1* genes (Table 1; Figure 1(b) and (c)). The *LAPTM5* gene encodes for a lysosomal-associated multispansing membrane protein that is known to be associated with spontaneous regression of neuroblastomas, pigmented villonodular synovitis, and lung cancer (Finis et al., 2006; Cortese et al., 2008; Inoue et al., 2009). The *SORT1* gene encodes for sortilin, a member of a family of cellular vacuolar protein sorting 10 domain receptors that is expressed in neurons of the central nervous system, including cortical, hippocampal, and cerebellar neurons, and peripheral nervous system. *SORT1* is known to regulate both neuronal viability and function through its regulation of both protein transport and signal transduction (Willnow et al., 2008) and is known to bind proNTs to control neuronal survival and cessation (Nykjaer and Willnow, 2012). Sortilin, which has multifunctional roles in intracellular trafficking of polipeptide from the golgi apparatus to secretory and endocytic pathways (Nielsen et al., 2001; Chen et al., 2005), has already been implicated in Alzheimer's disease (AD) and fronto-temporal lobar degeneration. In AD, sortilin has been shown to represent a major endocytic pathway for the clearance of apoE/A β complexes (Carlo et al., 2013) and to control APP processing to A β (Gustafsen et al., 2013), while in fronto-temporal lobar degeneration it has been shown to regulate extracellular levels of progranulin (PGRN; Hu et al., 2010). Sortilin has also been postulated as a risk factor for hypercholesterolemia and myocardial infarction (Musunuru et al., 2010). Interestingly, all of our *SORT1* mutation carriers were shown later to carry elevated levels of LDL cholesterol, suggesting a possible role of cholesterol homeostasis in the pathogenesis of tremor.

The entire coding region of *SORT1* was then examined in 61 Spanish ET cases (13 familial and 48 sporadic), but no pathogenic mutation was identified. Likewise, the exon 4 containing the *SORT1* mutation (p.Gly171Ala) was tested in additional 90 ET cases (28 familial ET and 62 sporadic), but no additional mutation carrier was identified.

Functional Assays

The SORT1 p.G171A mutation downregulates its mRNA and protein expression levels. To further test the pathogenicity of the *SORT1* p.G171A mutation, HEK293 cells were transfected with either wild-type or mutant (p.G171A) plasmids

and quantitative PCR (qPCR) on cDNA extracted from wild-type and mutant cells was carried out. Sortilin mRNA levels were found nearly three-fold lower in p.G171A mutation carriers than in noncarriers ($p < .0001$; Figure 3(a)), and a similar decrease of two-fold between wild-type and mutant cells was observed at the protein level ($p < .05$; Figure 3(b)). Because sortilin binds to the prodomains of both proNGF and proBDNF to regulate sorting of mature NGF and BDNF to appropriate endocytic and secretory pathways (Chen et al., 2005), transfected cells were also treated with proNGF, proBDNF, and with a combination of proNGF/proBDNF. Sortilin downregulation was consistent in both treated and untreated cells, suggesting that the treatment with proNTs has no effect on its mutant-related differential expression (Figure 3(a)–(c)).

The p75^{NTR} mRNA expression is increased in SORT1 p.G171A mutant cells. Given the role of sortilin in proNGF- and proBDNF-induced neuronal apoptosis via its interaction with p75^{NTR} (Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005) and the effects of the *SORT1* p.G171A mutation on mRNA and protein expression levels, we sought to determine whether this mutation may also alter the p75^{NTR} mRNA levels and the levels of apoptosis. The expression of p75^{NTR} in untransfected cells was first tested by direct qPCR: HEK293 cells expressed p75^{NTR}, and then examined in both wild-type and mutant *SORT1* transfected cells: p75^{NTR} mRNA levels were significantly increased in mutant cells when compared with their wild-type counterparts (Figure 4(a); $p < .05$, $p < .01$). This increase was more significant in cells treated with proBDNF and proNGF/proBDNF ($p < .01$). Although a slightly increase in apoptotic levels was found in p.G171A mutant cells treated with proNGF and proNGF/proBDNF together, these differences were not statistically significant (Figure 4(b)).

PGRN levels are not altered in SORT1 mutant cells or human mutation carriers. An exciting area of research is the role of sortilin function in the metabolism of PGRN because sortilin has been shown to regulate extracellular levels of PGRN *in vivo* (Hu et al., 2010) and *in vitro* (Lee et al., 2013). Thus, to determine whether the *SORT1* p.G171A mutation, which downregulates *SORT1* mRNA and protein levels and upregulates p75^{NTR} mRNA levels, may also be associated with increased PGRN levels in culture and human serum samples, PGRN levels were measured by ELISA. No differences in PGRN levels between wild-type and mutant cells (Figure 5(a)) and *SORT1* p.G171A mutation carriers versus noncarriers ($p = .65$; Figure 5(b)) were found.

Discussion

Despite significant efforts made to identify the genetic basis of ET, the results are limited with linkage,

Table 1. Heterozygous Disease-Segregating Mutations Identified Through WES. All Variants Were Absent in Large Number of Control Individuals.

Ch	Position	Gene	Nucleotide change	Protein change	Protein domain	Conservation ^a	Pathogenicity prediction ^b	ExAC data (EU fqcy)	Human brain expression ^c	Associated mechanisms/diseases
1	31,211,818	LAPTM5	c.479C > T	p.T160I	Mtp (28-261)	High	Deleterious	Not present	Medium	Lysosomal destabilization/neuroblastomas, PVNS, autoimmune diseases, and lung cancer
1	109,898,020	SORT1	c.512G > C	p.G171A	Vps10p (133-745aa)	High	Deleterious	Not present	High	NPs ligand, lysosomal sorting, endocytosis/FTD, heart diseases
19	48,946,504	GRIN2D	c.332IT > A	p.D1107E	None	Medium	Neutral	2/15,812	Medium	Schizophrenia

Note. EU fqcy refers to the frequency of the variants in the European population assessed in the ExAC; Mtp refers to Golgi 4-transmembrane spanning transporter.

WES = whole exome sequencing. VPS10p = vacuolar sorting protein 10 p; NPs = neuropeptides; PVNS = pigmented villonodular synovitis; FTD = fronto-temporal dementia; ExAC = Exome Aggregation Consortium.

^aConservation outcomes across different species were taken from the homologue NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).

^bPrediction of pathogenicity was determined by the following computational programs (See methods): MutPred, SNPs&Go, Mutation Taster, and SIFT.

^cHuman Brain Expression data were acquired from the Human protein atlas (<http://www.proteinatlas.org/>).

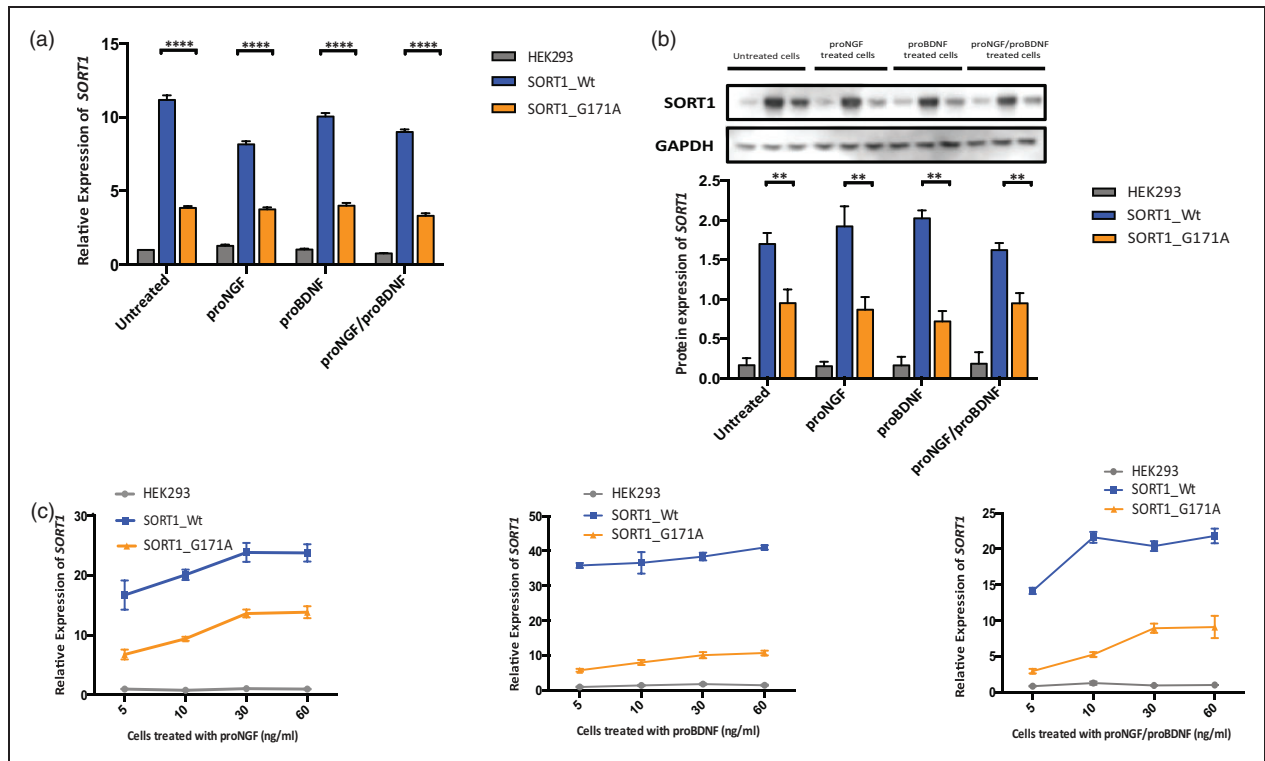


Figure 3. *SORT1* and sortilin expression in untreated and treated cells with proNTs factors. Gray columns represent untransfected HEK293 cells, blue columns HEK293 cells transfected with *SORT1* wild-type plasmid, and orange columns HEK293 cells transfected with *SORT1* G171A mutant plasmid. Real time PCR analyses for *SORT1* mRNA expression of HEK293 cells untreated and treated with proNTs are shown in (a) (10 ng/ml) and (c) (x-axis represents different concentrations of proNGF, proBDNF, and proNGF/proBDNF (5, 10, 30, or 60 ng/ml)). The housekeeping gene $\beta 2$ microglobulin (B2M) was used as control gene. Values represent the mean \pm SEM of two different experiments with nine replicates each. (b) Western blot analysis of sortilin and GAPDH proteins in cell lysates obtained from untransfected and transfected HEK293 cells with wild-type and mutant sortilin cultured for 4 days after transfection in the absence and presence of 10 ng/ml of proNGF, proBDNF, and a combination of proNGF/proBDNF. The full-length of sortilin (90 KDa) and GAPDH protein (37 KDa) that was used as a loading control are shown. Results are representative of three separate experiments. Values represent the mean \pm SEM. **** $p < .0001$, while ** $p < .05$.

genome wide association, and candidate gene studies failing to detect reliable risk and causative alleles for ET. Here, we examined a family presenting with a mild form of ET characterized by slow progression and beneficial response to alcohol consumption. A disease-segregating mutation resulting in p.Gly171Ala was identified in the *SORT1* gene through WES analyses. Because the expression of sortilin is altered in aging of the nervous system and under pathological conditions (Jansen et al., 2007), we first investigated whether the *SORT1* p.G171A mutation may also alter sortilin expression levels. A highly significant reduction of mRNA and sortilin expression levels was observed in mutant cells when compared with their wild-type counterparts (Figure 3(a) and (b)), suggesting that the *SORT1* p.G171A mutation identified in our ET patients is implicated in sortilin dysregulation. Since the expression of p75^{NTR}, which binds to sortilin to mediate neuronal cell death (Nykjaer et al., 2004) and modulates cholinergic transmission (Yang et al., 2002), was also found significantly elevated in

mutant cells when compared with wild-type (Figure 4(a)), one may commend that under pathological conditions dysregulation of sortilin may upregulate p75^{NTR} expression levels. Considering that p75^{NTR} is not only upregulated in pathological conditions (Nykjaer et al., 2005) but also in impaired GABAergic transmission (Riffault et al., 2014), the sortilin deficiency caused by the p.G171A mutation might also be responsible for defects in neurotransmission, resulting in both the development of tremor and high p75^{NTR} expression.

Given the role of sortilin as a principal neuronal binding site for PGRN and that a dramatic consequence of such binding is the rapid endocytosis of PGRN by sortilin (Hu et al., 2010), extracellular PGRN levels were also examined. Although PGRN levels were not disrupted in mutant cells versus wild-type (Figure 5(a)) or in mutation carriers versus noncarriers (Figure 5(b)), it has previously been reported that *SORT1* mutants known to disrupt endocytosis do not have altered PGRN levels (Nielsen et al., 2001; Hu et al., 2010), thus leaving the possibility

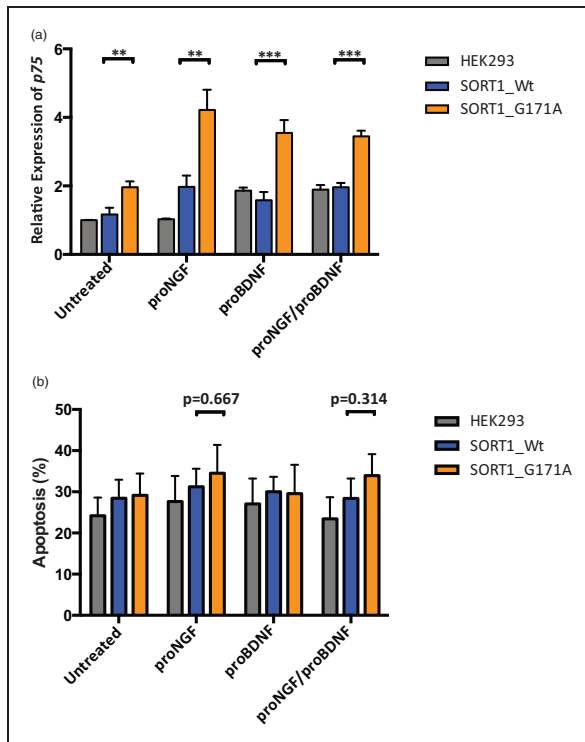


Figure 4. $P75^{NTR}$ mRNA expression and apoptotic cell death levels in wild-type and mutant *SORT1* cells. Gray columns represent untransfected HEK293 cells, blue columns HEK293 cells transfected with *SORT1* wild-type plasmid, and orange columns HEK293 cells transfected with *SORT1* mutant plasmid. (a) Relative quantification of $p75^{NTR}$ mRNA expression in untransfected and transfected HEK293 cells with either wild-type or mutant *SORT1* alleles. The y-axis shows the relative expression of the target gene ($P75^{NTR}$) relative to the internal control gene (*B2M*) and the x-axis shows treated and untreated cells with different proNTs (10 ng/ml). (b) Percentage of apoptosis in untransfected and transfected wild-type and mutant *SORT1* cells. The y-axis shows the percentage of cells in early apoptosis and the x-axis represents different proNT treatments. *** $p < .01$, ** $p < .05$.

that our *SORT1* mutation could still affect sortilin-mediated endocytosis, sorting, and trafficking, regardless of its effect on PGRN levels.

Lastly, noncoding *SORT1* variation has recently been associated with high cholesterol levels and heart diseases (Musunuru et al., 2010). There are mounting evidence that aberrations in cholesterol homeostasis can lead to severe neurological diseases and impairments in synaptic plasticity (Lane-Donovan et al., 2014); along these lines, high levels of serum total cholesterol have been associated with an increased risk for Parkinson's disease in Finnish population (Hu et al., 2008). The importance of cholesterol homeostasis for brain function was first highlighted by Niemann-Pick type C disease, in which pathogenic mutations result in impaired cholesterol trafficking and progressive neurodegeneration (Carstea et al., 1997;

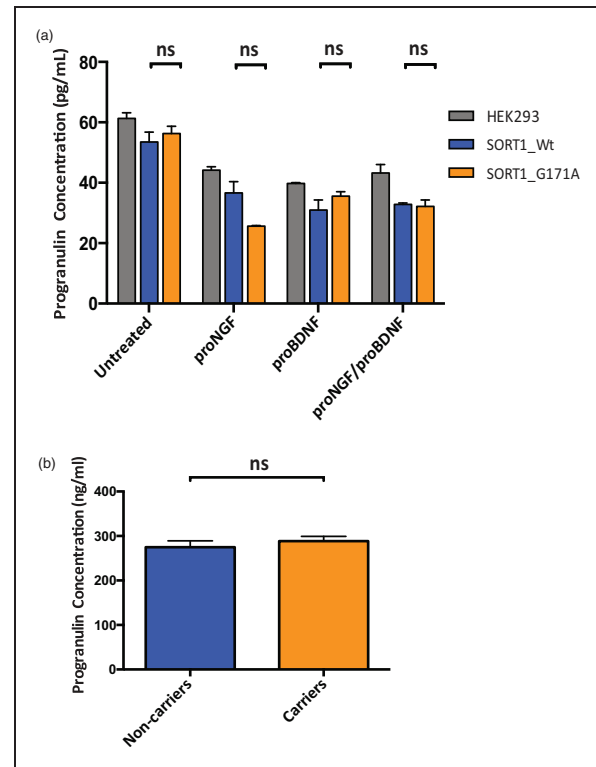


Figure 5. Progranulin expression in HEK293 cells and human serum samples. (a) PGRN levels in cells. Gray columns represent untransfected HEK293 cells, blue columns HEK293 cells transfected with *SORT1* wild-type plasmid, and orange columns HEK293 cells transfected with *SORT1* mutant plasmid. Values on the graph represent the mean \pm SEM of three independent experiments. (b) PGRN levels in human serum. The blue column represents PGRN levels for *SORT1* p.G171A noncarriers while the orange column is shown PGRN levels for p.G171A carriers. Values on the graph represent the mean \pm SEM of duplicate samples from each individual. Statistical analysis was done with GraphPad software. Non-parametric Mann-Whitney test were performed. ns = non significant.

Naureckiene et al., 2000). The association of a specific apolipoprotein E allele ($\epsilon 4$) with the risk for both sporadic and familial AD also raised the possibility that dysfunction in the lipid transport system may cause defects in the brain lipid homeostasis of AD patients (Poirier et al., 2014). Nowadays, it is known that lipoprotein receptors, which participate in synapse development, cargo trafficking, and signal transduction, are key players in AD pathogenesis and neurodegeneration; indeed, the association between impaired lipid metabolism and brain diseases including but not limited to AD, PD and Huntington's disease is well reported and documented (Lane-Donovan et al., 2014).

In conclusion, we here identified a disease-segregating *SORT1* mutation in a small family with early-onset ET (Figure 1(a)). The pathogenicity of the *SORT1* p.G171A

mutation is supported by its absence in neurologically normal population, its prediction as pathogenic by different computational programs, its high conservation across other orthologs (Figure 1(b)), its location in a relevant functional domain (Figure 1(c)), and its effects on both sortilin downregulation (Figure 3(a)–(c)) and p75^{NTR} upregulation (Figure 4(a)). While further research is still required, given the role of sortilin downregulation and p75^{NTR} upregulation in central nervous system impairment and neurodegeneration (Harrington et al., 2004; Jansen et al., 2007; Willnow et al., 2008) and taking into account that changes in the expression level of p75^{NTR} are correlated with functional changes in the GABAergic inhibitory neurotransmission (Blaesse et al., 2009), we hypothesize that the sortilin deficiency caused by the *SORT1* p.G171A mutation may lead to defects in neurotransmission, giving rise to the development of tremor.

Acknowledgments

The authors thank the patients, relatives, and other participants for their cooperation in this study.

Author Contributions

E. S., J. F. M.-M., and C. P. R. participated in the conception and design of the research project. E. S., C. E. K., and C. P. R. performed experiments. E. S., V. M., A. C., and C. P. R. analyzed experimental data. A. B., J. R. M., A. L. M., and J. F. M.-M. conducted clinical assessments. A. G. contributed with reagents and materials and performed P. G. R. N. assays in human serum samples. C. P. R. supervised experiments. J. F. M.-M. supervised clinical assessments. C. P. R. wrote the manuscript with help of E. S., A. B., and J. F. M.-M.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the “Instituto de Salud Carlos III” (FIS PI10/02714; JFM-M) and the Institute of Neurological Disorders and Stroke of the National Institute of Health (R21NS082881, R01NS079388; CPR).

References

- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV*. Washington, DC: Author.
- Bagepally, B. S., Bhatt, M. D., Chandran, V., Saini, J., Bharath, R. D., Vasudev, M. K., . . . Pal, P. K. (2012). Decrease in cerebral and cerebellar gray matter in essential tremor: A voxel-based morphometric analysis under 3T MRI. *Journal of Neuroimaging*, *22*, 275–278.
- Benito-Leon, J. (2014). Essential tremor: A neurodegenerative disease? *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*, *4*(252), 1–9.
- Benito-Leon, J., & Louis, E. D. (2006). Essential tremor: Emerging views of a common disorder. *Nature Clinical Practice Neurology*, *2*, 666–678. quiz 662p following 691.
- Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C., & Kaila, K. (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*, *61*, 820–838.
- Buijink, A. W., Caan, M. W., Tijssen, M. A., Hoogduin, J. M., Maurits, N. M., & van Rootselaar, A. F. (2013). Decreased cerebellar fiber density in cortical myoclonic tremor but not in essential tremor. *Cerebellum*, *12*, 199–204.
- Buyse, D. J., Reynolds, C. F. 3rd, Monk, T. H., Berman, S. R., & Kupfer, D. J. (1989). The Pittsburgh Sleep Quality Index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*, *28*, 193–213.
- Carlo, A. S., Gustafsen, C., Mastrobuoni, G., Nielsen, M. S., Burgert, T., Hartl, D., . . . Willnow, T. E. (2013). The proneurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid-beta peptide in the brain. *Journal of Neuroscience*, *33*, 358–370.
- Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., . . . Tagle, D. A. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*, *277*, 228–231.
- Chen, Z. Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C. X., Herrera, D. G., . . . Lee, F. S. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *Journal of Neuroscience*, *25*, 6156–6166.
- Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K., & Eckhardt, F. (2008). Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*, 1494–1508.
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., . . . Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, *43*, 491–498.
- Deuschl, G., Bain, P., & Brin, M. (1998). Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *13*(Suppl 3): 2–23.
- Elble, R. J., Sinha, R., & Higgins, C. (1990). Quantification of tremor with a digitizing tablet. *Journal of Neuroscience Methods*, *32*, 193–198.
- Exome Aggregation Consortium (ExAC). (2015). Cambridge, MA. Retrieved from <http://exac.broadinstitute.org>.
- Exome Variant Server (2015). *NHLBI Exome Sequencing Project (ESP)*. Seattle, WA: Author.
- Fahn, S., Tolosa, E., & Marin, C. (2003). *Clinical rating scale for tremor*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Finis, K., Sultmann, H., Ruschhaupt, M., Bunes, A., Helmchen, B., Kuner, R., . . . Berger, I. (2006). Analysis of pigmented villonodular synovitis with genome-wide complementary DNA microarray and tissue array technology reveals insight into potential novel therapeutic approaches. *Arthritis & Rheumatology*, *54*, 1009–1019.
- Gustafsen, C., Glerup, S., Pallesen, L. T., Olsen, D., Andersen, O. M., Nykjaer, A., . . . Petersen, C. M. (2013). Sortilin and SorLA

- display distinct roles in processing and trafficking of amyloid precursor protein. *Journal of Neuroscience*, *33*, 64–71.
- Harrington, A. W., Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J. C., Lee, R., Morl, K., . . . Giehl, K. M. (2004). Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 6226–6230.
- Hu, F., Padukkavidana, T., Vaegter, C. B., Brady, O. A., Zheng, Y., Mackenzie, I. R., . . . Strittmatter, S. M. (2010). Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron*, *68*, 654–667.
- Hu, G., Antikainen, R., Jousilahti, P., Kivipelto, M., & Tuomilehto, J. (2008). Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, *70*, 1972–1979.
- Inoue, J., Misawa, A., Tanaka, Y., Ichinose, S., Sugino, Y., Hosoi, H., . . . Inazawa, J. (2009). Lysosomal-associated protein multi-spanning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. *PLoS One*, *4*, e7099.
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J. R., Teng, K., Liubinski, O., Sjoegaard, S. S., . . . Nykjaer, A. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nature Neuroscience*, *10*, 1449–1457.
- Kuhlenbaumer, G., Hopfner, F., & Deuschl, G. (2014). Genetics of essential tremor: Meta-analysis and review. *Neurology*, *82*, 1000–1007.
- Lane-Donovan, C., Philips, G. T., & Herz, J. (2014). More than cholesterol transporters: Lipoprotein receptors in CNS function and neurodegeneration. *Neuron*, *83*, 771–787.
- Lee, W. C., Almeida, S., Prudencio, M., Caulfield, T. R., Zhang, Y. J., Tay, W. M., . . . Petrucelli, L. (2013). Targeted manipulation of the sortilin-progranulin axis rescues progranulin haploinsufficiency. *Human Molecular Genetics*, *23*, 1467–1478.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*, 402–408.
- Louis, E. D. (2010). Essential tremor: Evolving clinicopathological concepts in an era of intensive post-mortem enquiry. *The Lancet Neurology*, *9*, 613–622.
- Louis, E. D., Ford, B., Frucht, S., Barnes, L. F., X-Tang, M., & Ottman, R. (2001). Risk of tremor and impairment from tremor in relatives of patients with essential tremor: A community-based family study. *Annals of Neurology*, *49*, 761–769.
- Louis, E. D., Ottman, R., Ford, B., Pullman, S., Martinez, M., Fahn, S., . . . Hauser, W. A. (1997). The Washington Heights-Inwood Genetic Study of Essential Tremor: Methodologic issues in essential-tremor research. *Neuroepidemiology*, *16*, 124–133.
- Makino, C., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N., & Fukumaki, Y. (2005). Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2D gene, GRIN2D, and association study with schizophrenia. *Psychiatric Genetics*, *15*, 215–221.
- Marti-Masso, J. F., Bergareche, A., Makarov, V., Ruiz-Martinez, J., Gorostidi, A., de Munain, A. L., . . . Paisan-Ruiz, C. (2013). The ACMSD gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, *91*, 1399–1406.
- Merner, N. D., Girard, S. L., Catoire, H., Bourassa, C. V., Belzil, V. V., Riviere, J. B., . . . Rouleau, G. A. (2012). Exome sequencing identifies FUS mutations as a cause of essential tremor. *American Journal of Human Genetics*, *91*, 313–319.
- Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N. E., Ahfeldt, T., Sachs, K. V., . . . Rader, D. J. (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*, *466*, 714–719.
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., . . . Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*, *290*, 2298–2301.
- Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., . . . Petersen, C. M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *The EMBO Journal*, *20*, 2180–2190.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., . . . Petersen, C. M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, *427*, 843–848.
- Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2012). Sortilin: A receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences*, *35*, 261–270.
- Nykjaer, A., Willnow, T. E., & Petersen, C. M. (2005). p75NTR—live or let die. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*, 49–57.
- Poirier, J., Miron, J., Picard, C., Gormley, P., Theroux, L., Breitner, J., . . . Dea, D. (2014). Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(Suppl 2): S3–S10.
- Riffault, B., Medina, I., Dumon, C., Thalman, C., Ferrand, N., Friedel, P., . . . Porcher, C. (2014). Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABAA receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*, 13516–13534.
- Schrag, A., Munchau, A., Bhatia, K. P., Quinn, N. P., & Marsden, C. D. (2000). Essential tremor: An overdiagnosed condition? *Journal of Neurology*, *247*, 955–959.
- Symanski, C., Shill, H. A., Dugger, B., Hentz, J. G., Adler, C. H., Jacobson, S. A., . . . Beach, T. G. (2014). Essential tremor is not associated with cerebellar Purkinje cell loss. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *29*, 496–500.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., . . . Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*, 5455–5463.
- Thier, S., Lorenz, D., Nothnagel, M., Poremba, C., Papengut, F., Appenzeller, S., . . . Kuhlenbaumer, G. (2012). Polymorphisms in the glial glutamate transporter SLC1A2 are associated with essential tremor. *Neurology*, *79*, 243–248.
- Unal Gulsuner, H., Gulsuner, S., Mercan, F. N., Onat, O. E., Walsh, T., Shahin, H., . . . Tekinay, A. B. (2014). Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*, 18285–18290.
- Visser, M., Marinus, J., Stiggelbout, A. M., & Van Hilten, J. J. (2004). Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's

- disease: The SCOPA-AUT. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 19, 1306–1312.
- Willnow, T. E., Petersen, C. M., & Nykjaer, A. (2008). VPS10P-domain receptors – Regulators of neuronal viability and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 899–909.
- Yang, B., Slonimsky, J. D., & Birren, S. J. (2002). A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nature Neuroscience*, 5, 539–545.
- Zimprich, A. (2011). Genetics of Parkinson’s disease and essential tremor. *Current Opinion in Neurobiology*, 24, 318–323.

10.4 Trabajo 4.

SCN4A pore mutation pathogenetically contributes to autosomal dominant essential tremor and may increase susceptibility to epilepsy

Alberto Bergareche, Marcin Bednarz, Elena Sánchez, Catharine E. Krebs, Javier Ruiz-Martínez, Patricia De la Riva, Vladimir Makarov, Ana Gorostidi, Karin Jurkat-Rott, José Félix Marti-Masso, Coro Paisán-Ruiz

Hum Mol Genet. 2015 Dec 15;24(24):7111-20

La mutación de SCN4A contribuye patogenéticamente a una forma de temblor esencial autosómico dominante y puede aumentar la susceptibilidad a la epilepsia

El temblor esencial (TE) es el trastorno del movimiento más frecuente afectando a millones de personas en los Estados Unidos. A pesar de que la existencia de una historia familiar positiva es uno de los más importantes factores de riesgo para el TE, las causas genéticas del TE siguen siendo desconocidas. En un intento de identificar causas genéticas del TE, hemos realizado un análisis de secuenciación del exoma completo en una gran familia española con TE, en la que dos de los pacientes también sufrían de epilepsia. De cara a evaluar la patogenicidad, se llevaron a cabo análisis de mutagénesis dirigida al sitio, análisis de expresión en cerebro de ratón y humano y técnicas de fijación de membranas. Se identificó una mutación (p.Gly1537Ser) que segregaba con la enfermedad en el gen SCN4A. Los análisis funcionales posteriores demostraron que una cinética más rápida cuando los potenciales son cercanos al umbral altera la selectividad del paso de iones facilitando así la conductancia de los iones potasio y amonio, lo que puede contribuir, respectivamente, al temblor y a un aumento de la susceptibilidad a la epilepsia. En este trabajo, asociamos por primera vez, la variabilidad genética de SCN4A con el desarrollo de temblor esencial, lo que añade al TE a la creciente lista de canalopatías neurológicas.

ORIGINAL ARTICLE

SCN4A pore mutation pathogenetically contributes to autosomal dominant essential tremor and may increase susceptibility to epilepsy

Alberto Bergareche^{1,2,4,†}, Marcin Bednarz^{5,†}, Elena Sánchez⁶, Catharine E. Krebs⁶, Javier Ruiz-Martinez^{1,2,4}, Patricia De La Riva^{1,2,4}, Vladimir Makarov¹¹, Ana Gorostidi^{1,2,4}, Karin Jurkat-Rott^{5,‡}, Jose Felix Marti-Masso^{1,2,3,4,‡} and Coro Paisán-Ruiz^{6,7,8,9,10,*}

¹Movement Disorders Unit, Department of Neurology Hospital Universitario Donostia San Sebastián Guipuzcoa Spain, ²Biodonostia Research Institute, Area of Neurosciences, ³Department of Neurosciences University of the Basque Country, EHU-UPV San Sebastián Gipuzkoa Spain, ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Carlos III Health Institute, Madrid, Spain, ⁵Division of Neurophysiology, Ulm University, Albert-Einstein-Allee 11, 89070 Ulm, Germany, ⁶Department of Neurology, ⁷Department of Psychiatry, ⁸Department of Genetics and Genomic Sciences, ⁹Friedman Brain Institute, ¹⁰Mindich Child Health and Development Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA and ¹¹Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Ave, New York, NY 10065, USA

*To whom correspondence should be addressed at: Department of Neurology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY, USA. Tel: +1 212 2410108; Fax: +1 212 8284221; Email: coro.paisan-ruiz@mssm.edu

Abstract

Essential tremor (ET) is the most prevalent movement disorder, affecting millions of people in the USA. Although a positive family history is one of the most important risk factors for ET, the genetic causes of ET remain unknown. In an attempt to identify genetic causes for ET, we performed whole-exome sequencing analyses in a large Spanish family with ET, in which two patients also developed epilepsy. To further assess pathogenicity, site-directed mutagenesis, mouse and human brain expression analyses, and patch clamp techniques were performed. A disease-segregating mutation (p.Gly1537Ser) in the SCN4A gene was identified. Posterior functional analyses demonstrated that more rapid kinetics at near-threshold potentials altered ion selectivity and facilitated the conductance of both potassium and ammonium ions, which could contribute to tremor and increase susceptibility to epilepsy, respectively. In this report, for the first time, we associated the genetic variability of SCN4A with the development of essential tremor, which adds ET to the growing list of neurological channelopathies.

[†]The authors wish it to be known that the first two authors should be regarded as joint First Authors.

[‡]Please refer to Karin Jurkat-Rott for functional studies, Email: karin.jurkat-rott@uni-ulm.de and Jose Felix Marti-Masso for clinical studies, Email: josefelix.martimasso@osakidetza.eus.

Received: July 13, 2015. Revised and Accepted: September 25, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Introduction

Essential tremor (ET) is one of the most common neurological disorders and the most frequent adult-onset movement disorder, with an increased age-dependent prevalence of up to 5% in people 65 years old and over (1). Although its core motor symptom is a bilateral postural and kinetic tremor of the hands and arms, some patients also develop other motor and non-motor manifestations, including parkinsonism, myoclonus, dystonia, cerebellar dysfunction, sensory abnormalities, sleep disorders and cognitive and psychiatric features (2). The neuropathology of ET is not well understood and whether there is an underlying neurodegenerative process of the cerebellum in ET remains controversial (3). There is growing evidence that ET may not be a single disease but rather a family of diseases (4).

Although many concerns arise from methodological issues, there is a consensus that a positive family history is common in patients with ET (5). The genetic basis of ET remains elusive, however, partly due to the lack of stringent diagnostic criteria, the lack of biomarkers, a high phenocopy rate and high locus heterogeneity in presumably monogenic ET (5). In addition, misdiagnosis is a common feature in ET, with 37–50% of ET patients reportedly misdiagnosed (6). Although these associations have not been consistently replicated, genetic variants within the *LINGO1* (MIM #609791), *DRD3* (MIM #126451), and *HS1-BP3* (MIM #609359) genes have been reported to render susceptibility to ET (5,7). More recently, polymorphisms at the *SLC1A2* (MIM #600300) locus have also been shown to lend susceptibility to ET (8), and the *FUS* (MIM #137070), *HTRA2* (MIM #606441) and *SORT1* (MIM #602458) genes have been reported as causative ET genes using whole-exome sequencing (WES) analyses (9–11). Whereas the disease-associated mutation in the *FUS* gene was only present in 54% of individuals classified as having 'possible' ET, it fully segregated with disease in individuals with definite and probable ET (9).

In this study, we clinically examined a Spanish family with ET to identify the causative gene mutation. We utilized WES, which has been successfully demonstrated to identify the underlying genetic defect in clinically and genetically heterogeneous diseases in which traditional genetic approaches have failed (12,13).

Results

Clinical examination

Here, we report on a large family featuring ET in which two affected individuals also manifested epilepsy. The inheritance pattern was autosomal dominant. There were seven affected individuals over four different generations, and full clinical evaluation was conducted in five patients (Patients 1–5) and three unaffected family members (Fig. 1A). Two individuals were reported as having ET but were not examined by us, and DNA testing was not possible (Fig. 1A).

Case 1

Patient 1, who is now 73 years old, began suffering from generalized seizures precipitated by sleep deprivation at the age of 10 years. At the age of 30, he developed tremor of both hands. On physical examination, he showed postural tremor of both hands, head tremor, mild resting tremor and a mild ataxic gait without any other cerebellar, rigid-akinetic or dystonic signs. His tremor incapacitates him from writing and drinking. Electroencephalography (EEG) showed no pathological changes at rest without a photoparoxysmal response. Somatosensory evoked

potential (SEP) exhibited normal amplitude, and C-waves were not obtained. EMG recorded in the arms showed a tremor 8 Hz in frequency and 48–385 μ V in amplitude with the co-contraction of agonist and antagonist muscles (Fig. 2D and E). He scored 27 on the MoCA test and 36 on the Fahn-Tolosa-Marin tremor rating scale (TRS).

Case 2

Patient 2, who is 71 years old, began suffering from rare, generalized seizures precipitated by alcohol intake at the age of 20 years. He was treated with antiepileptic drugs until ~20 years ago, and since then, no attack has been experienced. He had an isolated myoclonus, and since 2005, he has suffered from tremor of both hands that improves with alcohol intake. He recently developed head tremor. On examination, he had postural tremor of both hands and head tremor, but no other cerebellar, rigid-akinetic or dystonic symptoms. Although his hand tremor incapacitates him from writing and drinking, he takes no medication. EMG recorded in the arms showed a tremor 3.5–4.5 Hz in frequency and 66–503 μ V in amplitude with the co-contraction of agonist and antagonist muscles. He scored 25 on the MoCA test and 40 on the TRS.

Case 3

Patient 3, who is 69 years old, has suffered from a symmetrical tremor of both hands since the age of 62. He initially had both postural and action tremor and later developed voice tremor. EMG recorded in the arms showed a tremor 6.6 Hz in frequency and 298 μ V in amplitude with the co-contraction of agonist and antagonist muscles. He scored 26 on the MoCA test and 29 on the TRS.

Case 4

Unaffected member 1 is now 68 years old and has a history of chronic anxiety without evidence of epileptic seizures or tremors. She showed no tremor.

Case 5

Patient 4, who is now 66 years old, suffers from a slightly asymmetric tremor of both hands that is more intense in the right hand, which has rendered her unable to write since the age of 54. On physical examination, she showed a mild head tremor but no other cerebellar, rigid-akinetic or dystonic signs. EEG showed no pathological changes at rest without a photoparoxysmal response. EMG recorded in the arms showed a tremor 6.6 Hz in frequency and 15.8 μ V in amplitude with the co-contraction of agonist and antagonist muscles. She scored 25 on the MoCA test and 16 on the TRS.

Case 6

Unaffected member 2 has a history of diabetes, ischaemic heart disease, depression, anxiety and alcohol abuse. He has no evidence of epileptic seizures or tremors and showed no tremor. He scored 15 on the MoCA test and is now 61 years old.

Case 7

Unaffected member 3 showed no tremor on examination and has no history of epileptic seizures or tremors. She scored 25 on the MoCA test and is now 59 years old.

Case 8

Patient 5 has suffered from head tremor since she started smoking tobacco at the age of 23. On recent examination, she showed a

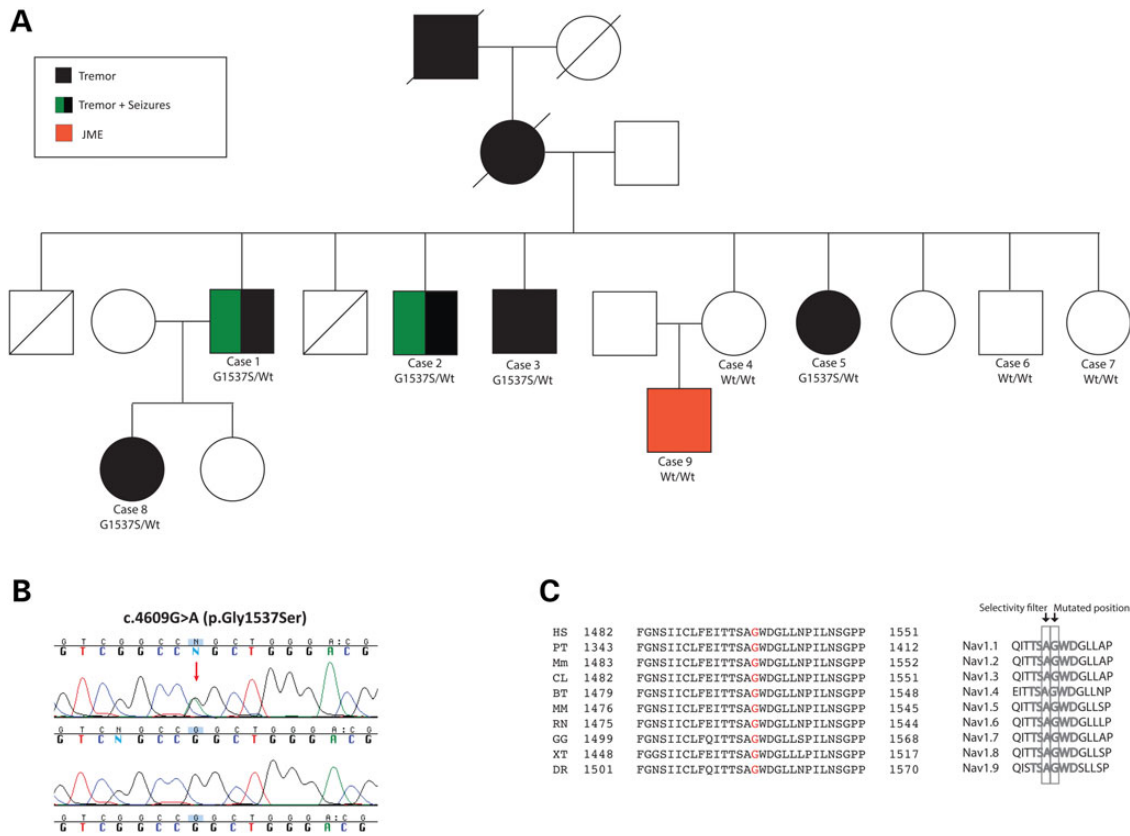


Figure 1. Autosomal dominant ET due to a SCN4A change-of-function mutation. (A) Pedigree structure. Heterozygous mutation carriers are represented as G1537S/Wt and non-carriers as Wt/Wt (A). (B) Sanger chromatogram sequences. Wild-type sequences are shown at the bottom and mutant sequences at the top. (C) Alignment of the SCN4A p.G1537S mutation. Left: alignment with different species; right: alignment with the whole sodium channel protein family each encoded by a different gene. HS: *H. sapiens*; PT: *P. troglodytes*; Mm: *M. musculus*; CL: *C. lupus*; BT: *B. taurus*; MM: *M. mulatta*; RN: *R. norvegicus*; GG: *G. gallus*; XT: *X. tropicalis*; DR: *D. rerio*.

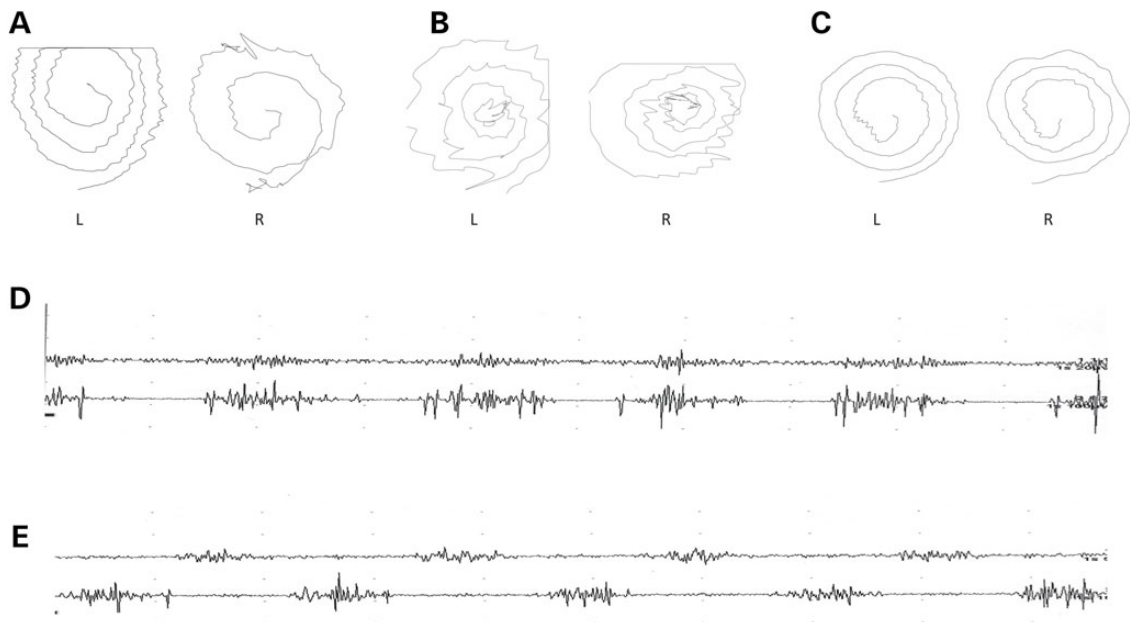


Figure 2. Archimedes spiral tests and EMG recordings of ET patients described in this study. (A–C) Archimedes spirals. Archimedes spirals were drawn on a digitizing tablet. L represents the non-dominant left hand, and R represents the dominant right hand. Left- and right-hand spirals of patients 1(A), 2 (B) and 4 (C) are shown. (D and E) Surface EMG (SEMG) recordings. SEMG recordings of Patient 1 at the postural position at rest and with the arms outstretched are illustrated. The upper register of each figure corresponds to the biceps and the lower to the triceps. SEMGs show a tremor with the synchronous pattern at rest (D) and an alternating pattern with the arms outstretched (E).

mild head tremor without tremor of the voice or limbs and no evidence of epileptic seizures. She is now 48 years old.

Case 9

Patient 6, who is 48 years old, began suffering from myoclonic jerks at the age of 15. In 2003, he also suffered from a generalized seizure after sleep deprivation, and an EEG recorded at the time showed generalized spike-wave discharges. His seizures showed a beneficial response to treatment with valproate, but he experienced a mild distal hand tremor with increasing amplitude at the end of the movement of the finger-nose test during treatment. EMG recorded in the arms showed an alternating tremor 10 Hz in frequency, probably secondary to treatment with valproate, as he showed typical characteristics of valproate-induced tremor, such as high frequency, low amplitude, short burst duration and a synchronous burst pattern (14). He was accordingly diagnosed with juvenile myoclonic epilepsy (JME).

Identification of SCN4A as the disease-causing gene

WES approaches were performed on four family members (Cases 2, 4, 8, 9), including two cases affected with ET (Cases 2 and 8), a case diagnosed with JME (Case 9) and an unaffected case (Case 4; Fig. 1A). Between 92.09% (Case 8) and 89.12% (Case 2) of the target exome at 20-fold coverage or higher was captured for all sequenced samples. Including only novel missense and nonsense coding variations, 972 single nucleotide variations (SNVs) for Case 9, 969 SNVs for Case 2, 942 SNVs for Case 4 and 849 SNVs for Case 8 were identified. Because her mother did not present any clinical symptoms, we considered that the individual with JME may also carry pathogenic mutations in the same disease gene, which may have reduced penetrance; thus, we searched for common variations between all four family members sequenced but failed to identify any genetic variation of this type. We then searched for common genetic variation between both ET patients subjected to WES approaches (Patients 2 and 5; Fig. 1A) and identified seven novel SNVs common to both of them. After validation through Sanger sequencing and the examination of these novel genetic variants in the remaining family members, only one was found to segregate with disease status (Fig. 1B). This disease-segregating mutation, which resulted in a G-to-A transversion at nucleotide 4609 and created a p.Gly1537Ser mutation, was localized in the SCN4A gene that encodes for a voltage-gated sodium channel (Nav1.4) protein. The Nav1.4 p.Gly1537Ser mutation was found to not only be conserved across other species but also across the α subunits of human voltage-gated sodium channel (SCN) genes (Fig. 1C). It was later proved to be absent in the normal population, including public databases ($n > 10\,000$) and ethnicity-matched controls ($n > 188$ chromosomes), and was predicted to be pathogenic by Alamut software and two other computational methods (MutPred score = 0.999; SNPs&Go score = Disease). While writing this article, we observed that this variant is currently listed in dbSNP (rs571210585) but without validation or frequency data and that it is now reported with very low frequency (6.63 E-05; 8/120 668) in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) data, which contains exome data for a variety of rare diseases, including rare neuromuscular diseases (15). This frequency is consistent with the disease, as the prevalence of ET in the general population is ~4.6% in individuals aged 65 years and older (1).

Although mutations in SCN4A (MIM #603967) are known to cause normo- (NormoKPP), hyper- (HyperKPP2) and hypokalemic periodic paralysis type 2 (HypoKPP2), congenital paramyotonia, myasthenic syndrome and severe neonatal episodic laryngospasm, the genetic variability of SCN4A is not associated with

the development of tremor (16–21). On the other hand, pathogenic mutations in other genes of the SCN family have been reported in epileptic syndromes (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN5A, SCN8A) and cardiac conduction defects (SCN1A, SCN3A, SCN5A) (18). Indeed, the p.Gly1537 amino acid is mutated in both SCN1A (p.Gly1725Cys) and SCN5A (p.Gly1712Ser) proteins, causing Dravet syndrome (MIM #601144) and Brugada syndrome (MIM #607208), respectively (22). Taken together, it is very likely that the SCN4A p.Gly1537Ser mutation is the disease-associated mutation responsible for the tremor phenotype described in our family. The SCN4A p.Gly1537Ser mutation was then examined in 76 sporadic and 25 familial Spanish patients with ET but was not detected. The entire coding region of the SCN4A gene was also examined in 22 additional cases with familial ET, but no other pathogenic mutation was identified.

SCN4A is expressed in both the mouse and human brain

Because SCN4A is generally considered to be expressed specifically in skeletal muscle (23), we first tested its expression in the mouse brain in comparison with skeletal muscle. The SCN2A gene that encodes a classical neuronal sodium channel was used as a control, and all reaction mixtures contained ACTB primers encoding β -actin to verify the reactivity of the reagents. Both SCN2A and SCN4A were amplifiable from both the muscle and brain (Fig. 3A). The expression of SCN4A was then confirmed in the human cerebral cortex (Fig. 3B), which strongly suggested the relevant expression of Nav1.4 in neuronal tissues.

The SCN4A p.G1537S mutation did not affect kinetics and voltage-dependent gating but altered ion selectivity

The SCN4A mutation identified in our family (p.G1537S) is situated in the portion of the IVS5-S6 loop that dips into the membrane and forms the lining of the pore, which is important for ion selectivity (24,25). To test for the possible functional significance of p.G1537S in the context of the ET phenotype, we performed whole-cell patch-clamp studies in a heterologous expression system. Increasing channel activation by 12.5 ms depolarization from a holding potential of -140 mV yielded an inward sodium current of overall similar density and voltage dependence as the wild type (Fig. 4A and B). From the current maxima, steady-state activation parameters were determined by fitting the current-voltage relationship with the equation $I = G_{\max} * (V - V_{\text{rev}}) / (1 + \exp((V_{0.5} - V)/k))$, whereby V_{rev} and G_{\max} are the reversal potential and maximum conductance of channels, respectively; $V_{0.5}$ is the potential for half-maximal current; V is the test potential and k is the slope factor. Although there was a tendency for mutant channels to have a lower threshold, no significant differences in any of the activation parameters were found between mutant and wild type (Fig. 4C and Table 1).

From the same data set, the time constants of fast inactivation (τ_h) were obtained by fitting a single exponential function to the current decay, $I = \exp(-t/\tau_h) + C$, whereby t is the time and C is the asymptote. For the majority of the voltage ranges, there were no significant differences in τ_h ; however, near the threshold at -40 and -35 mV, the mutant channels inactivated significantly more rapidly than the wild type, i.e. 1.48 ± 0.25 ms versus 3.2 ± 0.69 ms (-40 mV) and 0.94 ± 0.12 ms versus 1.54 ± 0.22 ms (-35 mV) with $P < 5\%$ (Fig. 4D). Additionally, we found a tendency towards the faster activation of mutant channels, i.e. reduced time-to-peak (Table 1). This faster gating in the near-threshold potential range (arrows in Fig. 4A and B) may contribute to the

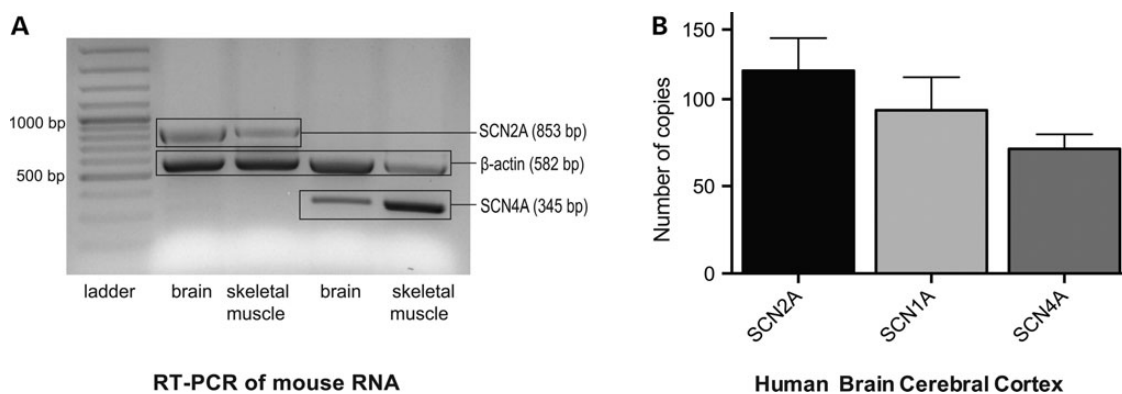


Figure 3. SCN4A expression in the mouse and human brain. (A) Mouse brain expression. Column 1: 100 bp ladder; Column 2: multiplex RT-PCR products of SCN2A and ACTB from brain RNA; Column 3: multiplex RT-PCR products of SCN2A and ACTB from muscle RNA; Column 4: multiplex RT-PCR products of SCN4A and ACTB from brain RNA; Column 5: multiplex RT-PCR products of SCN4A and ACTB from muscle RNA (Column 5). Note that SCN2A and SCN4A are expressed in both skeletal muscle and brain. The ubiquitously expressed ACTB encoding β-actin served as a control for the reactivity of the mix only. (B) Human brain expression. The expressions of SCN4A and other SCN genes known to be expressed in the human brain were evaluated by absolute quantification using the standard curve method. The y-axis represents the mRNA expression (in number of copies), and the x-axis represents the SCN genes tested in the cerebral cortex of the human brain.

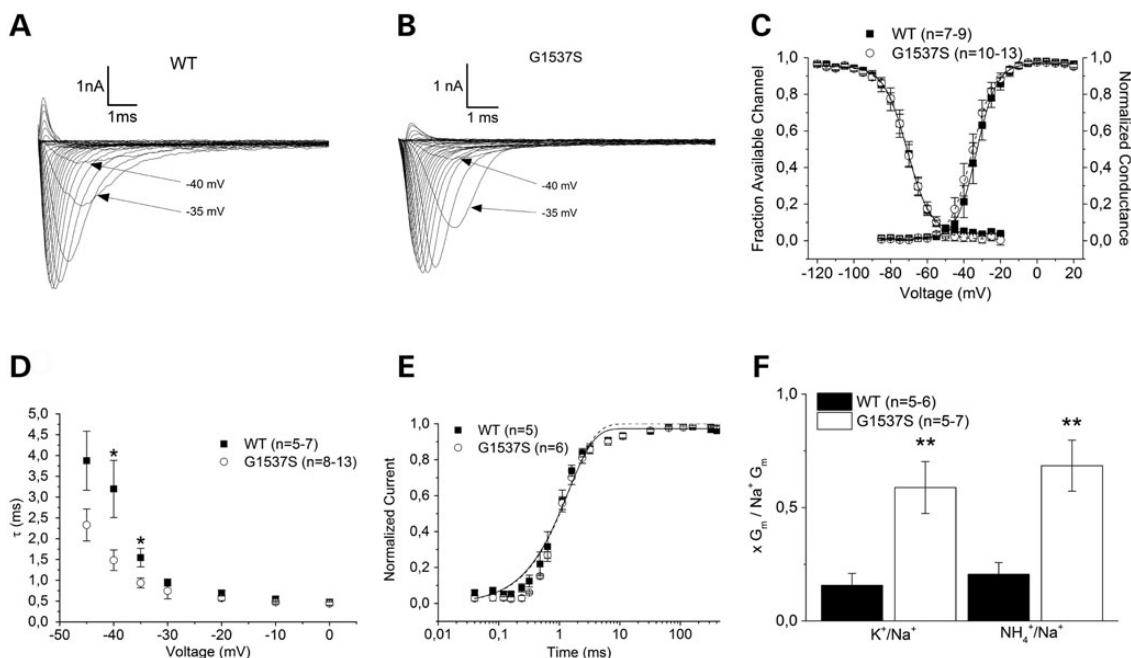


Figure 4. Functional study. (A and B) Sodium currents from heterologously expressed wild-type Nav1.4 (A) and G1537S (B) channels are shown. Note the more rapid kinetics of the mutant at potentials near the threshold, as highlighted by the arrows. (C) Conductance-voltage relationships from Boltzmann fits of steady-state activation and inactivation, which are similar for the WT and mutant. (D) Kinetics of inactivation determined by monoexponential fit. Note the significant acceleration of the mutant inactivation at -40 and -35 mV. (E) Recovery from fast inactivation as determined by a single exponential fit, which was similar for the WT and mutant. (F) Relative maximal conductance from solutions containing K^+ or NH_4^+ normalized to the maximal Na^+ conductance as calculated from Boltzmann fits. Note the 3.2- to 3.9-fold increased relative conductance of the mutant. All error bars represent the means \pm SEM. The P values are * <0.05 and ** <0.01 .

gradual amplitude decrease of repetitive action potential series during the neuronal oscillations that are typical for tremor. Steady-state inactivation was examined by a family of 50 ms test pulses from -120 mV to +20 mV following an inactivating 100 ms prepulse to -10 mV. Boltzmann functions were fitted to the data by the equation $I/I_{max} = A / (1 + \exp((V_{0.5} - V)/k)) + C$, whereby V represents the pre-pulse potential, $V_{0.5}$ represents the potential at which half of channels are inactivated, C represents the fraction of non-inactivated channels and k represents the slope factor. None of these parameters differed significantly between mutant and wild type (Fig. 4C and Table 1).

Recovery from the fast inactivation state was determined using a double pulse protocol with varying intermediate repolarization times to -140 mV with an inactivating 100 ms followed by a 50-ms test pulse, both to the same potential of -10 mV. The recovery from inactivation was analysed by fitting the data with a single exponential function, $I/I_{max} = A * (1 - \exp(-t/\tau))$, whereby τ denotes a time constant, A the fractional amplitude and C the level of non-inactivating sodium current. No significant difference was found for any of these parameters (Fig. 4E and Table 1).

Because of the close proximity of the p.G1537S mutation to the Nav1.4 selectivity filter of Domain IV at position A1536, we performed monovalent ion selectivity experiments by exchanging

Table 1. Fit parameters of the functional study

	Parameters	WT	±SEM	G1537S	±SEM
Activation n = 7–9	G_{\max} (pA/mV)	42.48	5.26	43.58	5.14
	V_{rev} (mV)	61.93	3.77	59.98	4.17
	$V_{0.5}$ (mV)	-33.07	2.15	-35.24	2.05
	k (mV)	4.32	0.64	4.01	0.55
Time to peak at -45 mV (ms)		2.67	0.5	2.12	0.29
Inactivation n = 8	A	0.92	0.01	0.97	0.02
	$V_{0.5}$ (mV)	-71.54	2.03	-70.47	1.61
	k (mV)	-5.45	0.20	-5.93	0.24
	C	0.04	0.01	0.01	0.02
Recovery n = 5–6	A	0.97	0.02	0.99	0.00
	τ (ms)	1.40	0.21	1.55	0.13

the permeable bath ion (sodium) for potassium and ammonium and eliminating all permeable ions from the pipette. Using the same activation protocol and Boltzmann fits as described above, we calculated the quotients of the maximal conductance ($G_{\max_K}/G_{\max_{Na}}$ and $G_{\max_{NH_4^+}}/G_{\max_{Na}}$) for the mutant and wild type (Fig. 4F). In both cases, the relative conductivities were significantly larger for the mutant, namely by a factor of 3.2–3.9, for ammonium (0.68 ± 0.11 versus 0.21 ± 0.5) and for potassium (0.59 ± 0.11 versus 0.15 ± 0.5), both with $P < 1\%$ and $n = 5–7$. These results suggest that SCN4A p.G1537S behaves as a change-of-function sodium channel mutation.

Discussion

Here, we described the phenotypic characteristics of a family featuring ET and epilepsy (two members) in which the age at the onset of symptoms ranged from 10 to 62 years. The five patients reported were clinically heterogeneous. Two patients featured generalized seizures and tremor occurring in the hands and head, two patients showed tremor of both hands, which progressed to head tremor in one patient and voice tremor in the other, and one patient (the youngest) showed only head tremor. Although these phenotypic heterogeneities are common in patients with familial cortical myoclonic tremor and epilepsy (FCMTE), in whom the onset of tremor and epileptic seizures could be simultaneous or occur within an interval that could extend up to several decades and in whom the age at onset may vary from 11 to 70 years (26), the electrophysiological studies performed did not support this diagnosis and showed the typical findings of ET. One family member was diagnosed with JME. We believe that the epilepsy in this subject was incidental, as it is not consistent with a dominant pattern of inheritance; however, we cannot rule out that the epilepsy in this case may also be related to the seizure activity seen in the other two patients, whereby the Nav1.4 mutation may act as an exacerbating factor.

A disease-segregating mutation (p.Gly1537Ser) was identified in the SCN4A gene. Until now, primarily myogenic disorders have been shown to be caused by SCN4A mutations, such as dyskalemic periodic paralyses, myasthenic syndromes and different forms of myotonia and paramyotonia (27). Therefore, Nav1.4 was thought to be a muscle-specific channel; however, our RT-PCR results confirm abundant levels of mRNA in neuronal tissue and suggest functional significance. A contribution of a change in Nav1.4 to a tremor phenotype may not be surprising considering that other sodium channels of the Nav family have been shown to produce tremor; for example, mice carrying SCN8A mutations not only present with paralysis, dystonia and muscle weakness

but also with tremor-ataxia phenotypes (28). Although some channelopathies produce relatively uniform phenotypes, SCN4A phenotypic variability is known to be associated with different presenting phenotypes, even in patients carrying the same pathogenic mutations, which clearly suggests that the SCN4A-associated phenotypic expression may be influenced by other genetic or epigenetic factors (18,29). This may explain why two of our SCN4A mutation carriers also developed epileptic seizures. It is also worth mentioning that two novel SCN4A mutations (p.Glu974Asp, p.Lys1126Ile) have recently been reported in a patient featuring NormoKPP with involuntary movements and generalized epilepsy (30). Our functional analyses of the p.Gly1537Ser mutation in whole-cell patch-clamp studies demonstrated a tendency towards faster activation and a significantly faster inactivation in near-threshold potentials of mutated channels, which may gradually decrease the amplitudes in repetitive action potential firing and facilitate the thalamic oscillations previously described for tremor (31). In this regard, it has been shown experimentally that increased sodium channel kinetics enhance oscillation after adding a rapidly gating Nav1.7 sodium channel (similarly rapid to Nav1.4) to the several times slower Nav1.8 sodium channel (involved in tremor in mice (28,32)), which resulted in larger amplitude subthreshold oscillation and increased repetitive firing (33). Such an oscillatory mechanism can be further enhanced by voltage-sensitive potassium conductance (34). Therefore, it is conceivable that the decreased ion selectivity along with the increased potassium conductance of the mutant enhances oscillation.

Our results also show significantly higher conductivity for ammonium ions in the mutated protein versus its wild-type counterpart, suggesting change-of-function behaviour. This is not unexpected, as our previous functional study showed that a cysteine mutation of the rat homologue of G1537 (rat-G1530C) exhibited an increased relative conductance of cations, such as lithium, potassium and ammonium (35,36). Such changes in ion selectivity are compatible with its location next to the known selectivity filter residue, A1536 (24). In fact, intoxication with ammonia (NH_4^+), which is released with glutamate during neuronal firing, or potassium has been shown to depolarize GABAergic neurons, impairing cortical inhibition and consequently causing neurological dysfunction and seizure activity (37,38), which could explain the presence of epileptic seizures in two of our reported SCN4A mutation carriers. The involvement of the inhibitory neurotransmitter GABA in the genesis of tremor is further supported by the GABAergic action of some drugs with tremorolytic properties, the reduced GABA levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of ET patients (39), the abnormally increased GABA_A-receptor binding in the cerebellothalamic pathways of ET patients (40,41) and the fact that deficiency of GABA_A-receptor $\alpha 1$ subunits produces an ET-like phenotype in mice (42).

The association of sodium channel genes with multiple phenotypes is not surprising because they are vital for the functioning of excitable tissue across various organ systems, including the nervous system, heart and muscle, and are responsible for generating and orchestrating the electrical signals passing through the brain, heart and muscle (43). In this study, we report the first autosomal dominant pedigree featuring ET due to a pathogenic change-of-function SCN4A mutation. Although we cannot prove that the reported SCN4A mutation is responsible for the seizure activity seen in two mutation carriers, given the SCN4A-associated phenotypic heterogeneity and the known role of the SCN family in epileptic syndromes, we conclude that SCN4A genetic variability may lead to increased seizure susceptibility. In conclusion, the pathogenicity of the p.Gly1537Ser

mutation is supported by its disease segregation status, its absence in ethnicity-matched neurologically normal individuals, its prediction as pathogenic by several computational methods, its location in relevant protein functions, and its effects on ion conductivity and selectivity. This finding associates the SCN4A mutation with the development of tremor and incorporates ET into the growing list of neurological channelopathies.

Materials and Methods

Subjects

A detailed family pedigree with ET was constructed by collecting clinical histories on all putatively affected and unaffected relatives. Written informed consent, fully approved by the local ethics committee of the *Hospital Universitario Donostia*, was obtained from all participants. All family members' DNA samples were isolated from whole blood using standard procedures.

Ninety-four DNA samples belonging to ethnicity-matched neurologically normal individuals (49 females and 45 males) without a family history of any movement disorders were also available. The age at sample collection of the control individuals ranged from 60 to 93 years with an average of 69.1 years. DNA samples from 25 familial ET patients and 76 sporadic patients were also examined for the disease-causing mutation identified in this study, and the entire coding region of the SCN4A gene was additionally examined in 22 familial ET cases.

Clinical evaluation

All participants in this study underwent a series of structured questionnaires and a comprehensive neurological and neuropsychological assessment undertaken at the Movement Disorders Unit by three experienced movement disorder specialists (A.B., J.R.M. and J.F.M.M.). Each patient received a diagnosis of ET after the first evaluation from a neurologist specializing in movement disorders. This diagnosis was subsequently confirmed by consensus with the rest of the team based on a review of the clinical data and electrophysiological records from the second evaluation using the formerly described diagnostic criteria. The Archimedes spiral tests used for evaluation are shown in Figure 2 and Supplementary Material, Figure S1.

Physical examination

The following standardized protocol was used: (1) demographic variables; (2) personal and family history and general medical health [Cumulative Illness Rating Scale score (range: 0–42), total number of prescription medications]; (3) neurological assessment: a subjective motor complaints questionnaire, the Activities-Specific Balance Confidence (ABC) scale, a motor examination including UPDRS part III and a general examination in order to detect dystonia, myoclonus, ataxia and polyneuropathy, as well as a specific tremor exploration that includes one test for postural tremor and five tests for kinetic tremor; (4) the use of medication (yes versus no); (5) additional variables of interest (e.g. age of symptom onset); (6) the SCOPA-AUT assessment of autonomic dysfunction (44) and (7) the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) (45). In an effort to minimize diagnostic pitfalls, the clinical criteria were comprehensively reviewed by the Consensus Statement of the Movement Disorder Society on Tremor (46) and the Washington Heights–Inwood Genetic Study of Essential Tremor criteria (47,48).

Neuropsychological and electrophysiological examination

In addition to the standard clinical exploration, the evaluation of subjects was carried out by recording the drawing of an 'Archimedes spiral' and using the Fahn-Tolosa-Marin TRS (49,50). The Montreal Cognitive Assessment (MoCA), which assesses different cognitive domains (<http://www.mocatest.org/>), was used to determine possible cognitive dysfunction (normal value >25), and DSM-IV criteria were used for the diagnosis of depression and anxiety disorders (51). EEGs were obtained after the application of electrodes and conducting jelly using the international 10–20 system of electrode placement. Standard techniques for nerve conduction studies were used. Peroneal and tibial motor responses and sural sensory responses were recorded. For SEPs, the median nerve at the wrist was stimulated, and upper limb SEPs were recorded at the contralateral scalp (C3' and C4'; 2 cm posterior to C3 and C4 on the international 10–20 system). The stimulation rate was 3 Hz, with a duration of 0.2 ms. Digital averaging was performed using 200 samples; the filters were set at a high cut of 500 Hz and a low cut of 10 Hz. The latencies of the N20 and P25 peaks and the interpeak amplitudes of N20–P25 were analysed. Averaging was typically performed three times to ensure reproducibility. Surface electromyographies (EMGs) were recorded from wrist extensor and flexor muscles using surface electrodes placed over the muscle bellies 3 cm apart. The filters were set with a band pass of 10 Hz–1 kHz. A triaxial accelerometer was placed over the first dorsal interosseous muscle of the hand. C-reflexes were recorded from the abductor pollicis brevis muscle after delivering a supramaximal stimulus over the median nerve in the wrist.

WES analyses

Four DNA samples were subject to WES analyses: two cases featuring ET (Cases 2, 8), one case featuring JME (Case 9) and an unaffected case (Case 4) (Fig. 1A). The SureSelect Human All exon 50 Mb exon-capture kit was used for library enrichment (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA), and captured libraries were sequenced on the HiSeq2000 according to the manufacturer's instructions for paired-end 100-bp reads (Illumina Inc., San Diego, CA), using a single flow cell lane per sample. Sequencing data were put through a computational pipeline for WES data processing and analysis following the general workflow adopted by the 1000 Genomes Project (52). Briefly, raw sequence reads were aligned to the human reference genome sequence (NCBI GRCh37.p13) using a fast lightweight Burrows–Wheeler Alignment Tool (BWA) (53), followed by a base-quality recalibration and local realignment through the Genome Analysis Toolkit (GATK v1.5-16-g58245bf); the GATK Unified Genotyper tool was used to call single-nucleotide substitutions (SNP/SNV) and short insertions/deletions (INDELS). Calls were then filtered based on mapping quality (q30 or higher) and depth of coverage (d10 or higher), and resulting calls were lastly annotated with an exhaustive genome annotation toolkit (AnnTools) (54). Each exome's statistics were conducted in PICARD (<http://picard.sourceforge.net/>).

Potential mutations observed as common variations (frequency >3%) in the latest dbSNP137 build, 1000 Genomes Project Phase 1, the Exome Variant Server of the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (55) or exomes generated in-house (13,56) were removed from further analyses. Genetic variants mapping to intra-genic, intronic and non-coding exonic regions,

with the exception of those variants mapping close to splice sites, were also removed because they were unlikely to be causative.

Alamut Visual 2.4.2 software (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-visual/>) was used to perform *in silico* analyses of the novel, disease-segregating SCN4A mutation identified in this study. Computational methods for the prediction of pathogenicity that were not included in the Alamut software, such as MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>) and SNPs&Go (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>), were also employed. The professional Human Gene Mutation Database (HGMD) (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php>) and the NCBI ClinVar database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) were used to determine whether the SCN4A p.Gly1537Ser mutation was already known to be associated with a disease-related phenotype.

Candidate gene screening

Genomic primers for PCR amplifications of the RIMS1 exon 21, KMT2C exon 30, UNC13B exon 8, AGAP5 exon 8, NFATC4 exon 2, ANKFN1 exon 16 and all SCN4A exons were designed using a public primer design website (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>) (primer sequences available upon request). All purified PCR products were sequenced in both the forward and reverse directions with Applied Biosystems BigDye terminator v3.1 sequencing chemistry as per the manufacturer's instructions. The resulting sequencing reactions were resolved on an ABI3730 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) and were analysed using Sequencher 5.2 software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Gene expression assays

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of brain (2-month-old mouse brain, Zyagen) and skeletal muscle mouse RNA (BioChain) was performed with the RT-PCR Kit from Qiagen and the primers are described in Supplementary Material, Table S1. The PCR products were run on a 1.5% agarose gel and stained with Red Safe (iNTRON Biotechnology) and sequenced for confirmation as previously described.

Total RNA from the human cerebral cortex was acquired from Clontech (Clontech, Mountain View, CA) and reverse transcribed into cDNA using the Omniscript reverse transcription kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilde, Germany). Absolute quantification using a standard curve generated with seven serial dilutions of cDNA (0.4–425 ng) was used to quantify the expression levels of the SCN1A, SCN2A and SCN4A genes. The SCN1A and SCN2A genes were used as control genes. All qPCR assays were performed on an Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA) using SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the oligonucleotide sequences are described in Supplementary Material, Table S1. The samples were run in quadruplicate, and non-template controls were included in each run. The data were automatically analysed with Eco software.

Functional analyses

Site-directed mutagenesis was performed by PCR of an SCN4A-containing pCRC-CMV-EGFP plasmid. TsA201 cells were transfected with wild-type or mutant cDNA using the jetPEI kit. Standard whole-cell recordings were performed with a $-p/4$ protocol to subtract the leak current. Data acquired with pCLAMP

10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) were filtered at 5 kHz and analysed by a combination of pCLAMP and ORIGIN (MicroCal) (Malvern Instruments, Westborough, MA). For the activation, inactivation and recovery experiments, the patch electrodes contained the standard solution (in mM): CsF 105, NaCl 35, EGTA 10 and HEPES 10. The bath contained the standard solution (in mM): NaCl 150, KCl 2, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1 and HEPES 10. The patch electrodes for the ion selectivity experiments contained the following (in mM): NMDG 140, EGTA 10 and HEPES 10. The bath contained the following (in mM): NaCl 152, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1 and HEPES 10. Additionally, the monovalent cations K⁺ or NH₄⁺ replaced Na⁺ as chloride salts for further permeability tests. Solutions were adjusted to pH 7.4, and experiments were performed at room temperature (20–25°C). All data are presented as the means ± SEM. Statistical significance was assessed by Welch's *t*-test for normally distributed data with criteria of $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We thank the patients, relatives and other participants for their cooperation in this study.

Conflict of Interest statement. The authors declare no conflicts of interest.

Funding

This work is supported in part by the 'Instituto de Salud Carlos III' (FIS PI10/02714; J.F.M.M.), the non-profit Hertie foundation (K.J.R.), the IonNeuroNet of the German Federal Research Ministry of Research (K.J.R.) and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke of the National Institutes of Health (R21NS082881, R01NS079388; C.P.R.).

References

- Louis, E.D. and Ferreira, J.J. (2010) How common is the most common adult movement disorder? Update on the worldwide prevalence of essential tremor. *Mov. Disord.*, **25**, 534–541.
- Louis, E.D. (2010) Essential tremor: evolving clinicopathological concepts in an era of intensive post-mortem enquiry. *Lancet Neurol.*, **9**, 613–622.
- Jellinger, K.A. (2014) Is there cerebellar pathology in essential tremor? *Mov. Disord.*, **29**, 435–436.
- Benito-Leon, J. (2014) Essential tremor: a neurodegenerative disease? *Tremor Other Hyperkinet. Mov.*, **4**, 1–9.
- Kuhlenbaumer, G., Hopfner, F. and Deuschl, G. (2014) Genetics of essential tremor: meta-analysis and review. *Neurology*, **82**, 1000–1007.
- Schrag, A., Munchau, A., Bhatia, K.P., Quinn, N.P. and Marsden, C.D. (2000) Essential tremor: an overdiagnosed condition? *J. Neurol.*, **247**, 955–959.
- Zimprich, A. (2011) Genetics of Parkinson's disease and essential tremor. *Curr. Opin. Neurol.*, **24**, 318–323.
- Thier, S., Lorenz, D., Nothnagel, M., Poremba, C., Papengut, F., Appenzeller, S., Paschen, S., Hofschulte, F., Hussl, A.C., Hering, S. *et al.* (2012) Polymorphisms in the glial glutamate transporter SLC1A2 are associated with essential tremor. *Neurology*, **79**, 243–248.

9. Merner, N.D., Girard, S.L., Catoire, H., Bourassa, C.V., Belzil, V. V., Riviere, J.B., Hince, P., Levert, A., Dionne-Laporte, A., Spiegelman, D. et al. (2012) Exome sequencing identifies FUS mutations as a cause of essential tremor. *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 313–319.
10. Unal Gulsuner, H., Gulsuner, S., Mercan, F.N., Onat, O.E., Walsh, T., Shahin, H., Lee, M.K., Dogu, O., Kansu, T., Topaloglu, H. et al. (2014) Mitochondrial serine protease HTRA2 p. G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 18285–18290.
11. Sánchez, E., Bergareche, A., Krebs, C.E., Gorostidi, A., Makarov, V., Ruiz-Martinez, J., Chorny, A., Lopez de Munain, A., Marti-Massó, J.F. and Paisán-Ruiz, C. (2015) SORT1 mutation resulting in sortilin deficiency and p75NTR upregulation in a family with essential tremor. *ASN Neuro*, **7**, pii: 1759091415598290.
12. Krebs, C.E. and Paisan-Ruiz, C. (2012) The use of next-generation sequencing in movement disorders. *Front. Genet.*, **3**, 75.
13. Marti-Masso, J.F., Bergareche, A., Makarov, V., Ruiz-Martinez, J., Gorostidi, A., Lopez de Munain, A., Poza, J.J., Striano, P., Buxbaum, J.D. and Paisan-Ruiz, C. (2013) The ACMSD gene, involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism. *J. Mol. Med. (Berl.)*, **91**, 1399–1406.
14. Mehndiratta, M.M., Satyawani, M., Gupta, S. and Khwaja, G.A. (2005) Clinical and surface EMG characteristics of valproate induced tremors. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*, **45**, 177–182.
15. Exome Aggregation Consortium (ExAC). (2015) Cambridge, MA. Accessed at <http://exac.broadinstitute.org> (07/2015).
16. Venance, S.L., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. and Tawil, R. (2004) SCN4A-associated hypokalemic periodic paralysis merits a trial of acetazolamide. *Neurology*, **63**, 1977.
17. Fontaine, B., Khurana, T.S., Hoffman, E.P., Bruns, G.A., Haines, J.L., Trofatter, J.A., Hanson, M.P., Rich, J., McFarlane, H., Yasek, D.M. et al. (1990) Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science*, **250**, 1000–1002.
18. Brunklaus, A., Ellis, R., Reavey, E., Semsarian, C. and Zuberi, S. M. (2014) Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *J. Med. Genet.*, **51**, 650–658.
19. Lion-Francois, L., Mignot, C., Vicart, S., Manel, V., Sternberg, D., Landrieu, P., Lesca, G., Broussolle, E., Billette de Villemeur, T., Napuri, S. et al. (2010) Severe neonatal episodic laryngospasm due to de novo SCN4A mutations: a new treatable disorder. *Neurology*, **75**, 641–645.
20. Ptacek, L.J., George, A.L. Jr, Barchi, R.L., Griggs, R.C., Riggs, J.E., Robertson, M. and Leppert, M.F. (1992) Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron*, **8**, 891–897.
21. Tsujino, A., Maertens, C., Ohno, K., Shen, X.M., Fukuda, T., Harper, C.M., Cannon, S.C. and Engel, A.G. (2003) Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7377–7382.
22. Walsh, R., Peters, N.S., Cook, S.A. and Ware, J.S. (2014) Paralogue annotation identifies novel pathogenic variants in patients with Brugada syndrome and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J. Med. Genet.*, **51**, 35–44.
23. Catterall, W.A., Goldin, A.L. and Waxman, S.G. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.*, **57**, 397–409.
24. Heinemann, S.H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K. and Numa, S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, **356**, 441–443.
25. Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K. and Numa, S. (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.*, **293**, 93–96.
26. van Rootselaar, A.F., van Schaik, I.N., van den Maagdenberg, A.M., Koelman, J.H., Callenbach, P.M. and Tijssen, M.A. (2005) Familial cortical myoclonic tremor with epilepsy: a single syndromic classification for a group of pedigrees bearing common features. *Mov. Disord.*, **20**, 665–673.
27. Nicole, S. and Fontaine, B. (2015) Skeletal muscle sodium channelopathies. *Curr. Opin. Neurol.*, **28**, 508–514.
28. Meisler, M.H., Kearney, J., Escayg, A., MacDonald, B.T. and Sprunger, L.K. (2001) Sodium channels and neurological disease: insights from Scn8a mutations in the mouse. *Neuroscientist*, **7**, 136–145.
29. Lee, S.C., Kim, H.S., Park, Y.E., Choi, Y.C., Park, K.H. and Kim, D.S. (2009) Clinical diversity of SCN4A-mutation-associated skeletal muscle sodium channelopathy. *J. Clin. Neurol.*, **5**, 186–191.
30. Cao, L., Li, X. and Hong, D. (2014) Normokalemic periodic paralysis with involuntary movements and generalized epilepsy associated with two novel mutations in SCN4A gene. *Seizure*, **24**, 134–136.
31. Shaikh, A.G., Miura, K., Optican, L.M., Ramat, S., Tripp, R.M. and Zee, D.S. (2008) Hypothetical membrane mechanisms in essential tremor. *J. Transl. Med.*, **6**, 68.
32. Xu, X., Guo, F., Lv, X., Feng, R., Min, D., Ma, L., Liu, Y., Zhao, J., Wang, L., Chen, T. et al. (2013) Abnormal changes in voltage-gated sodium channels Na(V)1.1, Na(V)1.2, Na(V)1.3, Na(V)1.6 and in calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase II, within the brains of spontaneously epileptic rats and tremor rats. *Brain Res. Bull.*, **96**, 1–9.
33. Choi, J.S. and Waxman, S.G. (2011) Physiological interactions between Na(v)1.7 and Na(v)1.8 sodium channels: a computer simulation study. *J. Neurophysiol.*, **106**, 3173–3184.
34. Amir, R., Liu, C.N., Kocsis, J.D. and Devor, M. (2002) Oscillatory mechanism in primary sensory neurones. *Brain*, **125**, 421–435.
35. Chiamvimonvat, N., Perez-Garcia, M.T., Ranjan, R., Marban, E. and Tomaselli, G.F. (1996) Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na⁺ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron*, **16**, 1037–1047.
36. Struyk, A.F. and Cannon, S.C. (2002) Slow inactivation does not block the aqueous accessibility to the outer pore of voltage-gated Na channels. *J. Gen. Physiol.*, **120**, 509–516.
37. Ye, X., Robinson, M.B., Pabin, C., Quinn, T., Jawad, A., Wilson, J. M. and Batshaw, M.L. (1997) Adenovirus-mediated in vivo gene transfer rapidly protects ornithine transcarbamylase-deficient mice from an ammonium challenge. *Pediatr. Res.*, **41**, 527–534.
38. Rangroo Thrane, V., Thrane, A.S., Wang, F., Cotrina, M.L., Smith, N.A., Chen, M., Xu, Q., Kang, N., Fujita, T., Nagelhus, E.A. et al. (2013) Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nat. Med.*, **19**, 1643–1648.
39. Mally, J., Baranyi, M. and Vizi, E.S. (1996) Change in the concentrations of amino acids in CSF and serum of patients with essential tremor. *J. Neural. Transm.*, **103**, 555–560.
40. Boecker, H., Weindl, A., Brooks, D.J., Ceballos-Baumann, A.O., Liedtke, C., Miederer, M., Sprenger, T., Wagner, K.J. and Miederer, I. (2010) GABAergic dysfunction in essential tremor: an 11C-flumazenil PET study. *J. Nucl. Med.*, **51**, 1030–1035.

41. Gironell, A., Figueiras, F.P., Pagonabarraga, J., Herance, J.R., Pascual-Sedano, B., Trampal, C. and Gispert, J.D. (2012) Gaba and serotonin molecular neuroimaging in essential tremor: a clinical correlation study. *Parkinsonism Relat. Disord.*, **18**, 876–880.
42. Kralic, J.E., Criswell, H.E., Osterman, J.L., O'Buckley, T.K., Wilkie, M.E., Matthews, D.B., Hamre, K., Breese, G.R., Homanics, G.E. and Morrow, A.L. (2005) Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knockout mice. *J. Clin. Invest.*, **115**, 774–779.
43. Ackerman, M.J. and Clapham, D.E. (1997) Ion channels—basic science and clinical disease. *N. Engl. J. Med.*, **336**, 1575–1586.
44. Visser, M., Marinus, J., Stiggelbout, A.M. and Van Hilten, J.J. (2004) Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT. *Mov. Disord.*, **19**, 1306–1312.
45. Buysse, D.J., Reynolds, C.F. III, Monk, T.H., Berman, S.R. and Kupfer, D.J. (1989) The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.*, **28**, 193–213.
46. Deuschl, G., Bain, P. and Brin, M. (1998) Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. *Mov. Disord.*, **13** (Suppl 3), 2–23.
47. Benito-Leon, J. and Louis, E.D. (2006) Essential tremor: emerging views of a common disorder. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, **2**, 666–678; quiz 662p following 691.
48. Louis, E.D., Ottman, R., Ford, B., Pullman, S., Martinez, M., Fahn, S. and Hauser, W.A. (1997) The Washington Heights-Inwood Genetic Study of essential tremor: methodologic issues in essential-tremor research. *Neuroepidemiology*, **16**, 124–133.
49. Elble, R.J., Sinha, R. and Higgins, C. (1990) Quantification of tremor with a digitizing tablet. *J. Neurosci. Methods*, **32**, 193–198.
50. Fahn, S., Tolosa, E. and Marin, C. (2003) *Clinical Rating Scale for Tremor*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
51. American Psychiatric Association. (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV*. American Psychiatric Association, USA.
52. DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M. et al. (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.*, **43**, 491–498.
53. Li, H. and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754–1760.
54. Makarov, V., O'Grady, T., Cai, G., Lihm, J., Buxbaum, J.D. and Yoon, S. (2011) AnnTools: a comprehensive and versatile annotation toolkit for genomic variants. *Bioinformatics*, **28**, 724–725.
55. Exome Variant Server. (2015) NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA. Accessed at <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (07/2015).
56. Krebs, C.E., Karkheiran, S., Powell, J.C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., Di Paolo, G., Walker, R.H., Shahidi, G.A., Buxbaum, J.D. et al. (2013) The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum. Mutat.*, **34**, 1200–1207.

