

Demencia vascular hereditaria tipo CADASIL en Colombia.

III. Análisis de ligamiento a *Notch3*

M. Arcos-Burgos^{a,b}, T. Restrepo^b, D. Rivera^b, L.G. Palacio^c, M. Castañeda^a, O. Palacio^b,
J. Arboleda^a, F. Lopera^a

VASCULAR HEREDITARY DEMENTIA CADASIL TYPE IN COLOMBIA. III. LINKAGE ANALYSIS TO *Notch3* GENE

Summary. Objective. To perform linkage analysis between the Short Tandem Repeats (STR) microsatellite markers D19S923, D19S929, D19S22, which are in strong genetic linkage to *Notch3* gene in order to contrast the hypothesis that the vascular hereditary dementia phenotype described in a multigenerational extended pedigree from Colombia correspond to CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy). Even we know that using techniques as the Single Strand Conformational Polymorphisms (SSCP) could determine mutations in *Notch3*, the rationality of this approach is that intronic variations could not be defined and that we are interested in determine if some forms of the clinical presentation and its phenotypic variability make part of CADASIL. Introduction. The CADASIL phenotype is caused by mutations in the *Notch3* gene. Clinical features of CADASIL are: 1. Recurrent cerebra-vascular episodes; 2. Migraine history; 3. History of transitory ischemic attack and, 4. Behavior changes and dementia. Material and methods. By using SIMLINK we showed that the extended genealogy had the enough power to detect significant LOD (logarithm of odds) score values when *Notch3* was considered the disorder cause. Linkage analysis was carried out by using parametric and non parametrical methods. The Elston-Stewart general method was used as the parametrical analysis and the sib pair method as the non-parametrical one. We perform simulations changing the affection status codification by including as affected or not including those individuals with migraine. Furthermore, in order to detect the stability of the results, we changed the penetrance values, the genetic frequencies on both, the marker loci and the affection locus. Results. The maximum pair-wise LOD score was 2.04 which was detected at the marker D19S23 with $\varphi = 0.11cM$. This distance correspond exactly with the *Notch3* location. That is 100 times more probable that there is linkage that there is not. In other words this probability could be explained as if the phenotype correspond to CADASIL than to other vascular dementia. The non parametric results were compatibles with the parametric ones. When the migraine symptom was considered as a part of the affected status, the LOD score values showed not linkage. Conclusions. The results of the linkage analysis to these STR microsatellite markers suggest that the vascular hereditary dementia phenotype described in this family correspond to CADASIL caused by a polymorphism on the *Notch3* gene. On the contrary, these same results suggest that the migraine phenotype is not a part of the progressive dementia. [REV NEUROL 2001; 32: 701-4]

Key words. Alzheimer's disease. Antioquia. CADASIL. Colombia. D19S22. D19S923. D19S929. Genetics. Linkage. Migraine. *Notch3*. Vascular dementia.

INTRODUCCIÓN

En artículos previos presentamos un grupo multigeneracional extendido, constituido por más de 500 individuos, en donde se observaba claramente conglomeración hereditaria de una forma de demencia vascular heredada (DVH) [1,2]. La contrastación de los diferentes modelos hereditarios, mediante el análisis de segregación compleja, demostró que el modelo que mejor explica la distribución de afectados en dicha genealogía es el del *locus* mayor dominante autosómico sin componente ambiental [2]. Basándonos en estos resultados, se hipotetizó que dicha demencia podía

corresponder a CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*), una arteriopatía cerebral con patrón de herencia autosómico dominante, que produce infartos subcorticales recurrentes y alteraciones de la sustancia blanca, similar a la leucoencefalopatía hipertensiva tipo Binswanger; pero con la diferencia de que en CADASIL no existe hipertensión ni factores de riesgo de enfermedad cerebrovascular, aunque se presenta con frecuencia junto con historia de migraña [3]. Este trastorno se describió en varias familias con el nombre de demencia multiinfarto hereditaria, vasculopatía esclerosante familiar y enfermedad de Binswanger familiar [3-6]. Desde 1991 se han estudiado más de 200 familias y la primera familia sospechosa de CADASIL en América Latina se describió en emigrantes españoles residentes en Uruguay [7].

La naturaleza hereditaria a veces no es aparente, ya que la penetrancia del trastorno se completa solamente alrededor de los 50-60 años. En el caso de la familia que hemos estudiado, la agregación familiar sugirió desde un principio una etiología genética en el CADASIL. En 1993 se comunicó ligamiento al cromosoma 19 en dos familias francesas, no relacionadas biológicamente, que presentaban fenotipo CADASIL [8]. Esto se confirmó en 13 familias más. Posteriormente, se clonó *Notch3*, como el gen sobre el cual mutaciones de su secuencia normal originaban la aparición del fenotipo CADASIL [9]. El gen *Notch3*, responsable del CADASIL, posee 33 exones y codifica una proteína transmembranal

Recibido: 07.11.00. Aceptado tras revisión externa sin modificaciones: 12.11.00.

^a Programa de Neurociencias. ^b Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Grupo de Genética de Poblaciones y de Epidemiología Genética. Universidad de Antioquia. ^c Instituto Neurológico de Antioquia. Medellín, Colombia.

Correspondencia: Dr. Mauricio Arcos-Burgos. Grupo de Genética de Poblaciones, Mutacarcinogenesis y Epidemiología Genética. Departamento de Biología. Universidad de Antioquia. AA 1226 Medellín, Colombia. E-mail: omarcos@matematicas.udea.edu.co

Agradecimientos. Este proyecto se financió con el programa de sostenibilidad a los grupos de investigación de la Universidad de Antioquia, al grupo de Neurociencias y de Genética de Poblaciones y Epidemiología Genética, para el desarrollo de la línea de investigación en aspectos genéticos de las enfermedades neurodegenerativas.

© 2001, REVISTA DE NEUROLOGÍA

tipo I de 2.321 aminoácidos, que se cree está comprometida en la diferenciación de las células grasas durante el desarrollo embrionario [10]. Aunque muchos autores piensan que *Notch3* es una molécula traductora de señales, otros opinan que actúa como una molécula de adhesión. Se siguen comunicando nuevas mutaciones en *Notch3* [11,12], que pueden aclarar las diferencias fenotípicas entre los diferentes grupos familiares. Sin embargo, llama la atención que a veces existe una marcada variabilidad intrafamiliar dentro de un grupo con la misma mutación.

Basándonos en los resultados del análisis de segregación y del análisis clínico de los individuos afectados en dicha familia, se hipotetizó que la causa directa de la afección en la genealogía era la existencia de un polimorfismo en el gen *Notch3*. Para contrastar dicha hipótesis diseñamos un experimento de ligamiento genético mediante el uso de los marcadores microsatélites o STR (*Short Tandem Repeats*) D19S923, D19S929, D19S22; éstos se encuentran flanqueando a *Notch3* en estrecho ligamiento y, por lo tanto, deberían distribuirse en la genealogía junto con cualquier polimorfismo existente en dicho gen. Está claro que otra forma de contrastar dicha hipótesis puede ser la evaluación directa de la secuencia de los exones de *Notch3*, mediante amplificación de los mismos, y detección de polimorfismos con SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphisms*), así como su secuenciación posterior, pero este método no detectaría cambios mutacionales ocurridos en intrones y/o fuera de la secuencia codificante. Así, las dos aproximaciones metodológicas son complementarias y, por lo tanto, deben llevarse a cabo simultáneamente, cuando la genealogía tenga suficiente poder para la detección de ligamiento genético. En este artículo se presenta el análisis de ligamiento genético en el que se sustenta que un polimorfismo en *Notch3* es la causa final del estado de afección en esta familia afectada con DCV.

MATERIAL Y MÉTODOS

En los artículos previos se describió extensamente las características clínicas de la familia y también la estructura genealógica de la misma [1,2]. En este estudio nos referiremos específicamente al análisis de ligamiento y a las simulaciones de poder llevadas a cabo para la detección de ligamiento a *Notch3*.

Los análisis de ligamiento se realizaron mediante el uso de métodos paramétricos y no paramétricos.

Análisis paramétrico (modelo general de Elston-Stewart)

Para poder llevar a cabo los análisis y debido a la magnitud de la genealogía se tuvo que dividir la genealogía original compacta en dos partes y se eliminaron los individuos que no aportaban información. Los parámetros relacionados con el modo de herencia, penetrancia, categoría de riesgo y tasas de mutación se tomaron del modelo general maximizado en el análisis de segregación [2]. En resumen, el modelo general de Elston y Stewart [13,14] estima que es plausible una configuración haplotípica determinada de los alelos sobre los *loci* marcadores y el alelo enfermo, en presencia de algún grado de ligamiento $0 < \alpha < 0,5$ (α representa la fracción de recombinación dada en centimorgans -cM-), dados los parámetros: modelo de herencia, penetrancias y frecuencias alélicas. Esta probabilidad se compara en términos de los logaritmos de las razones de disparidad (LOD -*logarithm of odds*- SCORE), cuando los mismos datos se presentan en ausencia de ligamiento $\alpha = 0,5$. Estos LOD score se maximizan para un valor específico de α . Un LOD score de 3 o mayor se toma como evidencia significativa de ligamiento, ya que indica una probabilidad de 1.000:1; es decir, que es 1.000 veces mejor explicar los datos en presencia de ligamiento que en ausencia de éste [15-17], LOD score entre -3,0 y 3,0 se consideran como no concluyentes y LOD score menores de -3 son indicativos de no ligamiento.

Análisis no paramétrico

El análisis no paramétrico de ligamiento se llevó a cabo mediante el método de *sib pair* (pares de hermanos) en sus dos versiones: aquella que usa sólo los

Tabla I. Secuencia de los primers para amplificación de los marcadores microsatélites.

Marcador microsatélite	Nombre del primer	Secuencia del primer
D19S222	AFM234vb2a	GAAATGTCCTATTTGAAACTGTGC
	AFM234vb2m	CTGTTGAAATGTATCCAGTAAATCG
D19S923	AFMb349xb1a	CGGCAGTAAGCCAAGATTGT
	AFMb349xb1m	CTAGTCACTGAGTTTGGACACTTTC
D19S929	AFMa041zd1a	TGATTTGGTGGATATTAGCCT
	AFMa041zd1m	CAACAGTGTGGCAGGG

individuos afectados y la que utiliza tanto individuos afectados como no afectados [18]. El método computa el número de alelos compartidos (estadístico de identidad por descendencia -IBD, del inglés *Identity by Descent*-) y no compartidos, entre todos los hermanos afectados y un solo probando, tomando el promedio de todos los hermanos que se pueden considerar probandos; además, se realiza considerando los hermanos no afectados, como se ha recomendado [19,20]. La significación estadística de los resultados obtenidos con el método de *sib pair* se evaluó mediante dos estadísticos: 1. Una prueba de la ji al cuadrado (χ^2), que representa efectivamente la suma de los estadísticos χ^2 para los pares de hermanos afectado/afectado, afectado/no afectado, y que se asume que teóricamente se distribuye como una χ^2 con dos grados de libertad; y 2. Con una prueba de medias que compara el número de alelos IBD, entre todos los pares de hermanos, con el número de alelos IBD no compartido entre todos los pares de hermanos. Para llevar a cabo los análisis paramétricos, nosotros usamos las frecuencias alélicas comunicadas en *Gen Bank* para la población caucasoide. Teniendo en cuenta que cambios sustanciales en la distribución de frecuencias genéticas poblacionales pueden ocasionar variaciones significativas en los valores de LOD score, realizamos simulaciones con frecuencias genéticas iguales de los alelos marcadores. Del mismo modo, se efectuaron simulaciones con variaciones de frecuencia del alelo enfermo usando valores entre 0,01 y 0,001, para observar el efecto de los posibles errores de estimación en los análisis de segregación que pudieran ocasionar sobre la estimación de los valores de LOD score. Además, para observar el comportamiento de los valores de LOD score, cuando el fenotipo de los individuos se consideraba como una entidad compleja (variable a través del tiempo y con penetrancias dependientes de la edad, con baja penetrancia en las primeras clases de susceptibilidad), se hicieron simulaciones cambiando los valores de penetrancia hasta el 99% en los genotipos afectados y considerando el hecho de ser afectado o no, cuando el individuo presentaba migraña. Se consideró este último criterio ya que existen varias comunicaciones en las que se describe a la migraña como el primer pródromo antes de que se presenten los primeros accidentes cerebrovasculares y el cuadro demencial final. Así, en una primera simulación se consideró que en el estado de afección sólo deberían incluirse aquellos individuos que cumplieran con la tríada: accidente cerebrovascular, demencia y resonancia magnética nuclear anormal. En una segunda simulación se consideró también, en el estado de afección, aquellos individuos que cumplieran con el criterio diagnóstico de migraña. Todos los análisis se realizaron con el programa informático ANALYSIS, versión 5.10 [21]. Por otro lado, se realizaron los análisis de simulación para determinar el poder de la genealogía y significancia de los LOD score utilizando SIMLINK [22].

Los STR D19S923, D19S929, D19S22, localizados en las inmediaciones del gen *Notch3*, se amplificaron mediante procedimientos estándar de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los primers descritos en la tabla I. En resumen, las PCR se realizaron en reacciones de 10 ml con 30 ng ADN genómico, Buffer de reacción para PCR1X PCR (1 X es 5 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 0,01 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 5% glicerol y 0,1% tritón X-100), 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Promega Corporation) y 5 pmol de cada primer, utilizando los protocolos establecidos así: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos; luego, la mezcla de reacción se amplificó por 30 ciclos utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56-58 °C para alineamiento, 1 minuto a 72 °C para extensión, un paso final de extensión por 5 minutos

Tabla II. Resultados del análisis de ligamiento.

Modelo	Fenotipo afectado sin incluir a individuos afectados de migraña. Valores paramétricos de acuerdo con el análisis de segregación compleja			Fenotipo afectado, sin incluir a individuos afectados de migraña. Valores paramétricos considerando penetrancias hasta del 90% en los fenotipos afectados			Fenotipo afectado, incluyendo individuos afectados de migraña. Valores paramétricos de acuerdo con el análisis de segregación compleja		
	D19S923	D19S929	D19S22	D19S923	D19S929	D19S22	D19S923	D19S929	D19S22
Z(t)	1,73	0,57	0,10	2,04	0,86	0,04	0,38	0,33	0,00
x(cM)	0,12	0,24	0,26	0,10	0,22	0,36	0,32	0,30	99,0
Sib pair máxima verosimilitud	1,52 (p= 0,004)	0,13 (p= 0,212)	0,00 (p= 0,5)	1,52 (p= 0,004)	0,13 (p= 0,212)	0,00 (p= 0,5)	0,85 (p= 0,021)	0,20 (p= 0,16)	0,00 (p= 0,5)
Sib pair NA máxima verosimilitud	0,25 (p= 0,140)	0,18 (p= 137)	0,00 (p= 0,5)	0,25 (p= 0,140)	0,18 (p= 137)	0,00 (p= 0,5)	1,54 (p= 0,003)	1,04 (p= 0,01)	0,00 (p= 0,5)
N-Z(t)	1,85	0,43	0,02	2,07	0,69	0,00	0,43	0,69	0,00
N-x(cM)	0,00	0,20	0,32	0,00	0,16	99,0	0,22	0,20	99
MP-Z(t)	Máximo valor de LOD score poliloci multipunto cuando se asume el orden D19S923-Notch-D19S929-D19S22 2,07 a una distancia del locus CADASIL de -0,11 el locus D19S923								

Locus: identificación del locus; Z(t): LOD score máximo; x(cM): distancia en el mapa desde el primer marcador en Haldane cM; Sib pair: valor de p para la prueba de medias en el análisis de pares de hermanos afectados (en inglés, Sib pair Affected); Sib pair NA: valor de p para la prueba de medias en el análisis de pares de hermanos afectados y no afectados; N-Z(t): LOD score máximo cuando el linaje extenso se rompe en familias nucleares; N-x(cM): distancia en el mapa desde el primer marcador en Haldane cM, cuando se usan familias nucleares; MP-Z(t): máximo LOD score poliloci multipunto.

72 °C extensión. Los alelos obtenidos se discriminaron por electroforesis vertical en geles de acrilamida al 6% y se visualizaron mediante tinción con plata de dichos geles, para lo cual se siguieron las indicaciones del fabricante (Promega, 1998). Como marcadores de peso se utilizaron los sistemas múltiplex (CTT triplex, FFv triplex, Silver™ III triplex) del Kit *GenPrint™* STR System (Silver Stain Detection), de Promega Corporation (Promega, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla II se presentan los resultados de los análisis de ligamiento paramétricos y no paramétricos unipunto y multipunto. Como puede observarse, los mejores resultados de LOD score paramétricos y no paramétricos se presentaron cuando el gen putativo *Notch3* se comparó con relación al marcador D19S923, el cual, efectivamente, se encuentra más cercano a *Notch3*, de acuerdo con los mapas estándar de las bases de datos de las secuencias del genoma humano. El mayor valor unipunto se presenta cuando se consideran las penetrancias cercanas a 1 (2,04). Esto significa que existe una probabilidad mayor de 100 veces de que exista ligamiento a *Notch3* frente a que no exista ligamiento, y que, por lo tanto, el gen causante de la DVH en este grupo familiar colombiano es, con una probabilidad muy alta, el *Notch3*.

Es muy importante tener en cuenta que cuando el fenotipo migraña se incluyó como una forma de CADASIL, expresado como un fenotipo afec-

tado con baja penetrancia, no se obtuvieron resultados de LOD score con valores que fueran significativos o que mostraran ligamiento a *Notch3*. Este efecto es muy interesante, porque sugiere que el fenotipo 'ser afectado de migraña' no representa un pródrómo de CADASIL. Una de las evidencias más importantes que confirman a *Notch3* como la causa de CADASIL es la correlación que existe entre los análisis paramétricos y los no paramétricos y los niveles de significación que se obtienen para los dos análisis. Otra evidencia que confirma a *Notch3* como la causa de CADASIL en esta familia se obtiene de los análisis de ligamiento multipunto; es decir, el análisis de ligamiento que considera haplotipos *multiloci* de los marcadores tipificados, en el cual se dispuso el mapa D19S23 a -0,11 cM del gen causante de la DVH, distancia donde, efectivamente, se sitúa este marcador con relación a *Notch3*. Finalmente, los resultados plantean la necesidad de realizar secuenciación en los exones en los que se han descrito un número alto de mutaciones o conglomerados de mutaciones que causan CADASIL, para definir el prototipo de mutación que origina la enfermedad. Dichos resultados nos permitirán comparar, diagnosticar, realizar seguimiento y definir por qué existe tan alta variabilidad en el comportamiento familiar de la enfermedad. Por otro lado, cuando se considera el fenotipo migrañoso, los resultados indican que es necesario establecer si, en realidad, la migraña es un pródrómo o si, efectivamente, existe una correlación alta con el desarrollo tardío de CADASIL.

BIBLIOGRAFÍA

- Lopera F, Arboleda J, Moreno S, Almeida N, Cuartas M, Arcos-Burgos M. Caracterización clínica de una familia numerosa con enfermedad vascular cerebral hereditaria en Colombia. *Rev Neurol* 2000; 31: 91-7.
- Lopera F, Arboleda J, Rivera N, Restrepo T, Arcos-Burgos M. Análisis de segregación compleja de una familia numerosa con enfermedad cerebrovascular hereditaria en Antioquia (Colombia). *Rev Neurol* 2001; 32: 222-5.
- Boussier MG, Tournier-Lasserre E. Summary of the Proceedings of the 1st. International Workshop on CADASIL. *Stroke* 1994; 25: 704-7.
- Chabriat H, Vahedi K, Iba-Zizen MT, Joutel A, Nibbio A, Nagy TG, et al. Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. *Lancet* 1995; 346: 934-9.
- Pullicino P, Benedict RHB, Capruso DX, Vella N. Neuroimaging criteria for vascular dementia. *Arch Neurol* 1996; 53: 723-8.
- Desmond DW, Moroney JT, Lynch T, Chan S, Chin SS, Shungu DC. CADASIL in a North American family clinical, pathologic, and radiologic findings. *Neurology* 1998; 51: 844-9.
- Lorenzo J, Fontán L, Dansilio, S, Cibils D. CADASIL. Descripción de la primera familia en Uruguay. Presentación de caso índice. *Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias* 1999; 1: 118-27.
- Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, Lathrop GM, Chabriat H, et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps on chromosome 19q12. *Nat Genet* 1993; 3: 256-9.
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, et al. *Notch3* mutations in CADASIL: a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; 383: 707-10.
- Joutel A, Vahedi K, Corpechot Ch, Troesch A, Chabriat H, Vayssié

- C, et al. Strong clustering and stereotyped nature of *Notch3* mutations in CADASIL patients. *Lancet* 1997; 350: 1511-5.
11. Goate AM, Morris JC. *Notch3* mutations and the potential for diagnostic testing for CADASIL. *Lancet* 1997; 350: 1490.
 12. Oberstein SA, Ferrari MD, Bakker E, Van Gestel J, Kneppers AL, Frants RR, et al. Diagnostic *Notch3* sequence analysis in CADASIL: three new mutations in Dutch patients. Dutch CADASIL Research Group. *Neurology* 1999; 52: 1913-5.
 13. Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered* 1971; 21: 523-42.
 14. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *PNAS* 1984; 81: 3443-6.
 15. Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955; 7: 277-318.
 16. Bailey NTJ. Introduction to the mathematical theory of genetic linkage. Oxford: Clarendon Press; 1961.
 17. Chotai J. On the Lod-Score method in linkage analysis. *Ann Hum Genet* 1984; 48: 359-78.
 18. Penrose LS. The detection of autosomal linkage in data which consist of pairs of brothers and sisters of unspecified parentage. *Ann Eugenics* 1935; 6: 133-8.
 19. Eaves L, Meyer J. Locating human quantitative trait loci: guidelines for the selection of sibling pairs for genotyping. *Behav Genet* 1994; 24: 443-55.
 20. Risch N, Zhang H. Extreme discordant sib-pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* 1995; 268: 1584-9.
 21. ANALYZE package by Joseph D. Terwilliger joe@well.ox.ac.uk, jdt3@columbia.edu, jterwilliger@ktl.fi, ftp.well.ox.ac.uk.
 22. Boehnke M, Ploughman LY. SIMLINK: a program for estimating the power of a proposed linkage study by computer simulation. Version 4.12. Ann Arbor: Department of Biostatistics, School of Public Health, University of Michigan; 1997.

DEMENCIA VASCULAR HEREDITARIA TIPO CADASIL EN COLOMBIA. III. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO A NOTCH3

Resumen. Objetivo. Realizar el análisis de ligamiento entre los marcadores microsatélites D19S923, D19S929 y D19S22, los cuales flanquean el gen *Notch3*, para contrastar la hipótesis de que el fenotipo enfermedad vascular hereditaria detectado en una extensa familia de Colombia es una arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL, Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy). Somos conscientes de que técnicas como el SSCP (Single Strand Conformational Polymorphisms) pueden dilucidar si hay mutaciones sobre *Notch3*, pero no darían información si existen alteraciones intrónicas. Introducción. El fenotipo CADASIL es causado por una mutación en el gen *Notch3*. El espectro clínico de esta enfermedad familiar consiste en episodios de infartos cerebrovasculares recurrentes, historia de migraña, isquemia cerebral transitoria, cambios de comportamiento y demencia. Material y métodos. Los análisis de ligamiento fueron llevados a cabo mediante el uso de métodos paramétricos y no paramétricos. El análisis paramétrico se realizó de acuerdo con el modelo general de Elston-Stewart. El análisis de ligamiento no paramétrico se efectuó mediante el método de sib pair (pares de hermanos). Se realizaron simulaciones variando el fenotipo de afectación de la enfermedad, incluyendo y no incluyendo individuos afectados de migraña, los valores de penetrancia, las frecuencias genéticas de los alelos de los loci marcadores y del locus enfermo, para determinar el efecto de estos cambios sobre los valores de LOD (logarithm of odds) score obtenidos. Resultados. Los resultados de LOD score máximos unipunto se presentaron cuando se consideró un valor de penetrancia cercana a 1 (2,04). El análisis de ligamiento multipunto cartografió el gen causante de la demencia vascular hereditaria en esta familia a 0,11 cM de D19S23, distancia a la cual se encuentra *Notch3*. Ello significa que existe una probabilidad mayor de 100 veces de que exista ligamiento a *Notch3* frente a que éste no exista y que, por ende, el gen causante de la demencia vascular hereditaria en este grupo familiar colombiano es, con una probabilidad muy alta, el *Notch3*. Los resultados de los análisis de ligamiento no paramétricos fueron similares a los resultados paramétricos. Estos valores de LOD score no se sostuvieron cuando se consideró la migraña como una forma de afectación con baja penetrancia. Conclusiones. Los resultados del análisis de ligamiento confirman que la forma de demencia vascular hereditaria que presenta esta familia colombiana es CADASIL, ocasionado por polimorfismos sobre *Notch3*. Del mismo modo, sugieren que el fenotipo migraña representa una entidad independiente del fenotipo CADASIL. Finalmente, los resultados plantean la necesidad de realizar secuenciamiento de los exones en los que se han descrito conglomerados de mutaciones que causan CADASIL. Dichos resultados permitirán comparar, diagnosticar, realizar seguimiento y definir por qué existe tan alta variabilidad en el comportamiento familiar de la enfermedad. [REV NEUROL 2001; 32: 701-4]

Palabras clave. Antioquia. CADASIL. Colombia. D19S22. D19S923. D19S929. Demencia vascular. Enfermedad de Alzheimer. Genética. Ligamiento. *Notch3*. Migraña.

DEMÊNCIA VASCULAR HEREDITÁRIA TIPO CADASIL EM COLÔMBIA. III. ANÁLISE DE LIGAÇÃO A NOTCH3

Resumo. Objetivo. Realizar análises da ligação entre os marcadores microsatélites D19S923, D19S929 e D19S22, que flanqueiam o gene *Notch3*, de forma a contrastar a hipótese de que o fenotipo da doença vascular hereditária detectado numa extensa família da Colômbia é o CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy). Estamos conscientes de que técnicas como o SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) podem ter utilidade se houver mutações do *Notch3*, mas não dariam informação se existirem alterações intrónicas. Introdução. O fenotipo CADASIL resulta de uma mutação no gene *Notch3*. O espectro clínico desta doença familiar consiste em episódios de enfartes vasculares cerebrais recorrentes, história de hemicrania, isquemia cerebral transitória, alterações de comportamento e demência. Material e métodos. As análises de ligação foram realizadas através de métodos paramétricos e não paramétricos. A análise paramétrica foi efectuada de acordo com o modelo geral de Elston-Stewart. A análise da ligação não paramétrica foi realizada pelo método de Sib Pair (pares de irmãos). Realizaram-se simulações variando o fenotipo de afectação da doença, incluindo e não incluindo indivíduos afectados por hemicrania, os valores de penetração, as frequências genéticas dos alelos dos loci marcadores e do locus doente de forma a determinar o efeito destas alterações sobre os valores de Lod-Score obtidos. Resultados. Os resultados do Lod-Score unipontos máximos cartografaram o gene causador da doença vascular hereditária e apresentaram-se quando se considerou um valor de penetração próximo de 1 (2,04). A análise da ligação multiponto cartografou o gene causador da doença vascular hereditária nesta família em 0,11cM de D19S23, distância a que se encontra o *Notch3*. Isto significa que existe uma probabilidade 100 vezes superior a que exista uma ligação ao *Notch3* face a que não exista ligação, e que o gene causador da demência vascular hereditária neste grupo familiar colombiano é uma muito provavelmente o *Notch3*. Os resultados das análises de ligação não paramétricas foram similares aos resultados paramétricos. Estes valores do Lod-Score não foram substituídos quando se considerou a hemicrania como forma de afectação com baixa penetração. Conclusões. Os resultados da análise de ligação confirmam que a forma de demência vascular hereditária que apresenta esta família colombiana é CADASIL, ocasionado por polimorfismos do *Notch3*. Da mesma maneira, sugerem que o fenotipo hemicrania, representa uma patologia independente do fenotipo CADASIL. Estes resultados permitir-nos-ão comparar, diagnosticar, seguir e definir porque existe tão alta variabilidade no comportamento familiar da doença. [REV NEUROL 2001; 32: 701-4]

Palavras chave. Antioquia. CADASIL. Colômbia. D19S923. D19S929. D19S22. Demência vascular. Doença de Alzheimer. Genética. Ligação. *Notch3*. Hemicrania.