



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL



**ANÁLISIS DE LA ETIOPATOGENIA DEL CADASIL
MEDIANTE ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS Y
ESTIMACIÓN DEL PRONÓSTICO TRAS EL ICTUS
ISQUÉMICO EN EL CADASIL**

Autora: Elena Muiño Acuña

Directores:

Israel Fernández Cadenas

Jaume Roquer González

Joan Montaner Villalonga

Tutor: Jaume Roquer González

Universidad Autónoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Realizada en el “Institut de Investigació Biomèdica de Sant Pau” y el “Hospital de la Santa Creu i Sant Pau”



Barcelona, 13 de enero del 2020

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me han apoyado durante estos años en los que he estado trabajando en el doctorado.

Por una parte, a mis directores de tesis. Sin ellos no podría haber llevado a término mis trabajos de investigación. Y muy especialmente a Israel, que aceptó llevarme de la mano a pesar de las dificultades de querer estudiar una enfermedad considerada rara. Gracias por tus consejos, por permitirme que de vez en cuando mi imaginación volase, ayudándome a mantener los pies en la tierra y dar sentido a aquello en lo que creo.

Agradecer a mis compañeros de grupo su compañía en este largo viaje. Cris, gracias por tus consejos para la redacción de esta tesis, tu frescura y positivismo han sido de gran ayuda. Natalia, gracias por tu inestimable colaboración en los experimentos realizados, sin ti, parte de este proyecto no podría haber sido posible. Caty, gracias por querer siempre resolver nuestras dudas y hacer más fácil el trabajo de laboratorio, parte importante de este trabajo también te la debo a ti. Nuria, gracias por toda tu ayuda desinteresada, tu creatividad y tus ganas de animarme con análisis bioinformáticos. Jara, gracias por tu ojo crítico, tus ganas de resolver los problemas que surgen y tu tiempo para mis dudas (y también gracias por esconderme el turrón de chocolate, aunque al final lo acabe encontrando), eres una compañera de despacho única y espero poder seguir aprendiendo cosas de ti en el futuro.

Gracias también a compañeros que, aun no formando parte de nuestro grupo de investigación, han permitido que esto fuera posible. Ejemplos de ello, Joan Balandó, tu rigurosidad y meticulosidad hace que aquello en lo que colabores destaque; y también gracias por los momentos de congresos de risas infinitas. Gracias Mónica y Noemí, vuestra amabilidad, ganas de ayudar, sonrisa contagiosa, y paciencia ante mis dudas de laboratorio, me ayudaron mucho en el tiempo que estuve en Terrassa.

Gracias Olga y a todos los compañeros del Hospital del Mar donde me formé como neuróloga. A los que fueron mis adjuntos, y a los que, como yo, éramos residentes. Irene, mi coR, Miguel, mi hermano mayor, Alicia la neuro-hematóloga gemela, Laura, mi pequeño saltamontes...

Un agradecimiento especial a la Asociación CADASIL España, vuestro esfuerzo es digno de admiración, y espero poder seguir colaborando con vosotros en todos los proyectos que se nos planteen.

Gracias a mis amigas de A Coruña, juntas, poco a poco, hemos ido superando todos los retos que se nos han presentado hasta llegar tan lejos como hemos querido.

GRACIAS a mi familia. A vosotros os lo debo todo. Jose, siempre que te he necesitado has estado ahí, desde consejos personales, hasta resolución de problemas bioinformáticos. Se que puedo contar contigo y que puedo aprender mucho de ti. Vito, compartimos defectos y virtudes, siempre nos apoyamos la una a la otra, no me imagino haber llegado aquí sin nuestras llamadas telefónicas tranquilizadoras. Mamá, papá, vosotros me habéis enseñado a ser como soy y valorar lo que realmente es importante. Siempre me he sentido protegida y apoyada a vuestro lado, sois las personas más admirables que he conocido nunca. Familia, os quiero.

Por último, a ti Ernesto darte las GRACIAS también. Sin tu apoyo durante estos años no habría tenido las fuerzas suficientes para seguir adelante. A pesar de las dificultades siempre has estado ahí para recordarme en lo que creo y para hacerme sentir que no hay nada imposible. GRACIAS por tu buen humor, tu ironía y, sobre todo, GRACIAS por darme el regalo más bonito que he tenido nunca. Tú y Marta sois lo mejor que podría desear.

ABREVIATURAS

CADASIL: *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*.

GOM: material granular osmiófilo.

VSMC: células del músculo liso vascular.

ExAC: *Exoma Aggregation Consortium*

EGFr: repeticiones del tipo EGF (*Epidermal Growth Factor*)-like.

AIT: accidentes isquémicos transitorios.

ECD: dominio/subunidad extracelular.

NRR: región reguladora negativa.

ICD: dominio intracelular.

RAM: *recombination signal binding protein-1 for J κ (RBP-J κ)-associated molecule*.

CSL: *C promoter binding factor-1 -CBF1-, Suppressor of hairless, Lag-1*.

DSL: *Delta/Serrata/Lag-2*.

HES: *hairy enhancer of Split*.

Hey: *hairy/enhancer of split-related with YRPW motif*.

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*.

SMA: *smooth muscle α -actin*.

GTEx: *Genotype-Tissue Expression*.

WMH: hiperintensidades de sustancia blanca de presumible origen vascular.

SSCP: *single-strand conformation polymorphism*.

DHPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

NGS: *Next-Generation Sequencing*.

HS: hiperintensidades subcorticales.

GWAS: *Genome-wide association study*.

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.

EPD: espacios perivasculares dilatados.

MMSE: *Mini-Mental State examination*.

MDRS: *Mattis Dementia Rating Scale*.

mRS: *modified Rankin Scale*.

GWTS: *Genome-Wide Transcriptomic Study*.

MAF: frecuencia del alelo minoritario.

qRT-PCR: *real-time quantitative reverse transcription protein chain reaction*.

MOCA: *Montreal Cognitive Assessment.*

WMS-III: *Wechsler memory scale-III.*

WAIS-III: *Wechsler Adult Intelligence Scale.*

SDMT: *Symbol Digit Modalities Test.*

TMT-A: *Trail Making Test part A.*

RMA: *Robust Multi-array Average algorithm.*

DLP: dislipemia.

FA: fibrilación auricular.

PCR: proteína C reactiva.

AUC: área bajo la curva ROC.

TOAST: Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment Subtype Classification.

IC: intervalo de confianza.

DSS: Dutch Stroke Score.

ÍNDICE

1. Resumen	13
2. Introducción	17
2.1. Epidemiología	20
2.2. <i>NOTCH3</i> -Notch3	22
2.2.1. Estructura	22
2.2.1.1. <i>NOTCH3</i>	22
2.2.1.2. Notch3	22
2.2.2. Vía de señalización de Notch	25
2.2.3. Función de Notch3	26
2.2.4. Expresión genética	27
2.2.5. Mutaciones patogénicas	29
2.3. Etiopatogenia	29
2.3.1. Alteración histopatológica	30
2.3.1.1. Células endoteliales	31
2.3.1.2. Células musculares lisas de los vasos sanguíneos	31
2.3.1.3. Pericitos	31
2.3.1.4. Agregación de Notch3	32
2.3.1.5. Hiperintensidades de sustancia blanca	34
2.3.2. Procesamiento y función de Notch3	34
2.3.2.1. Hipofunción	34
2.3.2.2. Normofunción	35
2.3.2.3. Hiperfunción	35
2.3.3. Alteración de la autofagia	35
2.3.4. Alteración mitocondrial	36
2.3.5. Hipoperfusión y alteración de la vasorreactividad	36
2.3.6. Alteración colinérgica	36
2.4. Clínica	38
2.4.1. Migraña	38
2.4.2. Alteraciones psiquiátricas	39
2.4.3. Ictus	40
2.4.4. Deterioro cognitivo	41
2.5. Hallazgos de la neuroimagen en pacientes con CADASIL	42

2.5.1. Hiperintensidades subcorticales en CADASIL	43
2.5.2. Espacios perivasculares dilatados	43
2.5.3. Microsangrados cerebrales en CADASIL	43
2.6. Diagnóstico	44
2.6.1. Marcadores de la RMN para el diagnóstico de CADASIL	44
2.6.2. Diagnóstico histológico	45
2.6.3. Diagnóstico genético	45
2.7. Pronóstico	47
2.8. Tratamiento	48
2.8.1. Inmunoterapia	50
2.8.2. <i>Exon skipping</i>	50
3. Objetivos	51
4. Materiales y métodos	55
4.1. Revisión sistemática de pacientes con sospecha de CADASIL y mutaciones puntuales en <i>NOTCH3</i> , sin afectación del número de cisteínas	57
4.2. Estudio de los genes diferencialmente expresados en las biopsias de piel de pacientes con CADASIL y controles	61
4.2.1. Participantes	61
4.2.2. Variables	62
4.2.3. Extracción del ARN	64
4.2.4. Estudio de la expresión diferencial mediante la tecnología de <i>microarrays</i> (GWTS)	64
4.2.5. Estudio de la expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR ..	64
4.2.6. Análisis estadístico	66
4.2.7. Perfil de expresión	68
4.2.8. Consideraciones éticas	68
4.3. Creación de un modelo pronóstico para estimar la discapacidad al tercer mes de haber padecido un ictus isquémico y su utilidad en pacientes con CADASIL	69
4.3.1. Participantes	69
4.3.1.1. Cohorte de descubrimiento	69
4.3.1.2. Cohorte de replicación	69
4.3.1.3. Cohorte CADASIL	69
4.3.1.4. Criterios de inclusión de la cohorte de descubrimiento y de la cohorte de replicación	70

4.3.1.5.	Criterios de exclusión de la cohorte de descubrimiento y de la cohorte de replicación	70
4.3.1.6.	Consideraciones éticas	71
4.3.2.	Variables	71
4.3.3.	Web-tool	72
4.3.4.	Análisis estadístico	72
4.3.4.1.	Creación del modelo	72
4.3.4.2.	Evaluación del modelo	73
4.3.4.3.	Estudio del modelo según la clasificación TOAST	74
4.3.4.4.	Estudio de las posibles diferencias	74
5.	Resultados	75
5.1.	Revisión sistemática de pacientes con sospecha de CADASIL y mutaciones puntuales en <i>NOTCH3</i> , sin afectación del número de cisteínas	77
5.1.1.	Descripción de las mutaciones obtenidas	77
5.1.2.	Características clínico-epidemiológicas de los casos índices	82
5.1.3.	Mutaciones puntuales que afectan a <i>NOTCH3</i> y que no afectan al número de cisteínas del receptor, consideradas potencialmente patogénicas	85
5.2.	Estudio de los genes diferencialmente expresados en las biopsias de piel de pacientes con CADASIL y controles	89
5.3.	Creación de un modelo pronóstico para estimar la discapacidad al tercer mes de haber padecido un ictus isquémico y su utilidad en pacientes con CADASIL	100
5.3.1.	Creación del modelo	100
5.3.2.	Cohorte de replicación	103
5.3.3.	Evaluación del modelo	104
5.3.4.	Estudio de las diferencias entre los pacientes con una discapacidad correctamente estimada por el modelo y los erróneos	108
5.3.5.	Comparativa de los principales modelos predictivos de discapacidad	108
5.3.6.	Estimación de la discapacidad al tercer en mes en pacientes con CADASIL y con un ictus isquémico	111
6.	Discusión	113
6.1.	Revisión sistemática de pacientes con sospecha de CADASIL y mutaciones puntuales en <i>NOTCH3</i> , sin afectación del número de cisteínas	115
6.1.1.	Limitaciones	118

6.2. Estudio de los genes diferencialmente expresados en las biopsias de piel de pacientes con CADASIL y controles	120
6.2.1. Limitaciones	122
6.3. Creación de un modelo pronóstico para estimar la discapacidad al tercer mes de haber padecido un ictus isquémico y su utilidad en pacientes con CADASIL	124
6.3.1. Limitaciones	128
7. Conclusiones	133
8. Líneas de futuro	137
9. Bibliografía	141
10. Anexos	167
Anexo I. Systematic Review of Cysteine-Sparing <i>NOTCH3</i> Missense Mutations in Patients with Clinical Suspicion of CADASIL	169

RESUMEN

1. RESUMEN

El CADASIL es una arteriopatía sistémica causada por mutaciones en *NOTCH3*, que afectan al número de cisteínas del dominio extracelular del receptor, alterando los puentes disulfuro y propiciando un mal plegamiento de este, y su agregación junto con la de otras proteínas; mecanismo que actualmente se considera responsable de la enfermedad. Considerada una enfermedad rara, es la causa más frecuente de ictus y demencia de causa hereditaria. Debido a la variabilidad fenotípica del CADASIL, incluso dentro de una misma familia, se ve dificultada la posibilidad de establecer un pronóstico certero en estos pacientes, en una enfermedad sin tratamiento.

El objetivo principal de esta tesis es profundizar en la etiopatogenia de la enfermedad a través del estudio de la expresión diferencial en las biopsias de piel de los pacientes con CADASIL respecto a controles sanos, a través de un *Genome-Wide Transcriptomic Study* (GWTS). Como objetivos secundarios se quiso estudiar si mutaciones que no afectasen al número de cisteínas podrían considerarse patogénicas, a través de la revisión sistemática en la literatura de estas; y crear un modelo para predecir el grado de discapacidad en pacientes con ictus isquémico y testarlo en pacientes con CADASIL.

Como resultado del trabajo de la presente tesis, se ha encontrado que existen mutaciones que no afectan al número de cisteínas, y que pueden ser consideradas patogénicas y causantes de CADASIL (p.R61W, p.R75P, p.D80G y p.R213K). Por tanto, mecanismos diferentes y/o adicionales a la alteración producida por la aparición de un número impar de cisteínas, podrían causar el CADASIL.

Por otra parte, el estudio transcriptómico ha puesto de manifiesto que *E2F4* se encuentra sobreexpresado en pacientes con CADASIL, y que esta sobreexpresión se correlaciona de forma negativa con el rendimiento de las pruebas que valoran la función ejecutiva y la atención y velocidad de procesamiento de la información, dominios cognitivos característicamente afectados en pacientes con esta enfermedad.

Por último, el *Parsifal Score* es un modelo que predice el estado funcional de un paciente con un ictus isquémico, a los tres meses. Este modelo también es eficaz para predecir la discapacidad, en el caso de pacientes con CADASIL y un ictus isquémico.

ABSTRACT

CADASIL is a systemic artery disease caused by mutations in *NOTCH3*, which affect the number of cysteines in the extracellular domain of the receptor, altering the disulfide bridges and causing a missfolding of the receptor, and its aggregation along with other proteins; a mechanism currently considered responsible for the disease. Considered a rare disease, it is the most frequent cause of stroke and dementia of hereditary cause. Due to the phenotypic variability of CADASIL, even within the same family, the possibility of establishing an accurate prognosis in these patients, in a disease without treatment, is difficult.

The main objective of this thesis is to deepen in the etiopathogenesis of the disease through the study of the differential expression in skin biopsies of patients with CADASIL with respect to healthy controls, through a Genome-Wide Transcriptomic Study (GWTS). As secondary objectives we wanted to study if mutations that do not affect the number of cysteines could be considered pathogenic, through the systematic review in the literature of these; and to create a model to predict the degree of disability in patients with ischemic stroke and test it in patients with CADASIL.

As a result of the work of this thesis, it has been found that there are mutations that do not affect the number of cysteines, and that can be considered pathogenic and cause CADASIL (p.R61W, p.R75P, p.D80G and p.R213K). Therefore, different and/or additional mechanisms to the alteration produced by the appearance of an odd number of cysteines, could cause CADASIL.

On the other hand, the transcriptomic study has shown that *E2F4* is over-expressed in patients with CADASIL, and that this over-expression is negatively correlated with the performance of tests that assess executive function and attention and speed of information processing, cognitive domains characteristically affected in patients with this disease.

Finally, the Parsifal Score is a model that predicts the functional status of a patient with an ischemic stroke, at three months. This model is also effective in the case of CADASIL patients with ischemic stroke.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy; OMIM#125310) es una arteriopatía sistémica de causa no aterosclerótica ni amiloidea, con herencia autosómica dominante, aunque también puede presentarse de forma esporádica, por mutaciones *de novo* en el gen *NOTCH3* (1).

En 1955, se describía a dos hermanas con una encefalopatía de rápida evolución de tipo Binswanger, con demencia, alteraciones de la marcha, parálisis pseudobulbar, crisis epilépticas y déficits focales neurológicos, junto con una historia familiar de demencia de inicio temprano (2). Posteriormente, fueron publicados más casos de familias con leucoencefalopatía y pequeños infartos subcorticales múltiples, también de inicio temprano, y un patrón de herencia autosómico dominante (3), en cuya biopsia de piel, evaluada por microscopía electrónica, aparecía un material granular osmíófilo (GOM), en la lámina basal de las células del músculo liso vascular (VSMC) y en los capilares (4).

Hoy en día, se sabe que los principales síntomas del CADASIL son: la migraña con aura, las alteraciones psiquiátricas, los pequeños ictus isquémicos subcorticales recurrentes de inicio precoz y la demencia temprana (5), siendo la causa más frecuente de ictus y demencia de causa hereditaria (6). Y, por otra parte, que la identificación de los GOMs en las biopsias de piel, son específicos de la enfermedad (7).

Diferentes nombres se han utilizado, inicialmente, para describir el CADASIL: demencia multi-infarto hereditaria, vasculopatía familiar esclerosante (2), vasculopatía crónica familiar o ictus isquémico mendeliano con leucoencefalopatía (8). En 1993, se acuñó el término CADASIL, para referirse a esta condición caracterizada por ictus isquémicos recurrentes y demencia hereditaria (8).

Gracias al análisis de ligamiento de dos grandes pedigrís franceses, se localizaba, por primera vez, la posición del gen asociado a CADASIL, encontrándose entre los marcadores *D19S221* y *D19S222*, en el cromosoma 19q12. Posteriores estudios, llevaron a la reducción del tamaño de la región de interés a unas 800 kilobases. En 1996, a través de diferentes estrategias como el aislamiento de secuencias conservadas inter-especie, la selección de ADN complementario y el clonaje de islas CpG, se encontraron 12 genes en

esta localización. Uno de ellos era el ortólogo de ratón de *NOTCH3* (9). Se identificaba así, el gen causante de CADASIL, enfermedad considerada modelo genético de la enfermedad de pequeño vaso cerebral.

Aun siendo la causa más frecuente de ictus y demencia de causa hereditaria, el CADASIL forma parte de las consideradas enfermedades raras. Sin embargo, en 2016, se encontró que hasta 3,4/1.000 individuos presentaban mutaciones responsables del CADASIL, poniendo en cuestión la etiqueta, de este, como enfermedad rara. Todo ello, gracias a la vertiginosa mejora en las técnicas de secuenciación y a la rigurosa caracterización clínica, que incluso ha llevado a postular que Friedrich Nietzsche padecía la enfermedad (10).

2.1. EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de CADASIL, históricamente se ha enmarcado dentro de las consideradas enfermedades raras o poco frecuentes, que son aquellas patologías cuya prevalencia en la población es inferior a 2/1.000 individuos.

Los primeros esfuerzos para aproximarse a la prevalencia real de CADASIL, aparecen en el año 2005, cuando se quiso estimar la prevalencia mínima de esta enfermedad, en el Este de Escocia (11). Estudiando los exones 3, 4, 5 y 6 del gen *NOTCH3* o las biopsias de piel de aquellos pacientes con sospecha de CADASIL, del área de Greater Glasgow y Lanarkshire, se estableció la prevalencia mínima calculada de la enfermedad, en el este escocés, en 1,98/100.000 individuos adultos. En 2012, se confirmaba una prevalencia mínima equiparable en el noreste de Inglaterra (1,32/100.000 individuos adultos) (12). Sin embargo, estudios posteriores encontraban una prevalencia mínima en Escocia y en el Centro de Italia de casi el doble: 4,1/100.000 individuos adultos (13,14).

Finalmente, en 2016 y 2018, a través del estudio de repositorios públicos genéticos, primero en el *Exoma Aggregation Consortium* (ExAC) (15), que contiene información del exoma de 60.706 individuos de distintos puntos geográficos, y en la que no se incluye ninguna cohorte específica de ictus o demencia; y posteriormente en el gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org>) (16), que es la base de datos expandida del ExAC, y que contiene 123.136 exomas y 15.496 genomas completos; se elevó la prevalencia de mutaciones patogénicas, que conllevan la aparición del CADASIL (ver apartado “2.2.5. Mutaciones patogénicas”), a 3,2-3,4/1000 individuos. En la Figura 1 se representa la

frecuencia de mutaciones patogénicas de CADASIL, según las poblaciones incluidas en la base de datos ExAC (15).

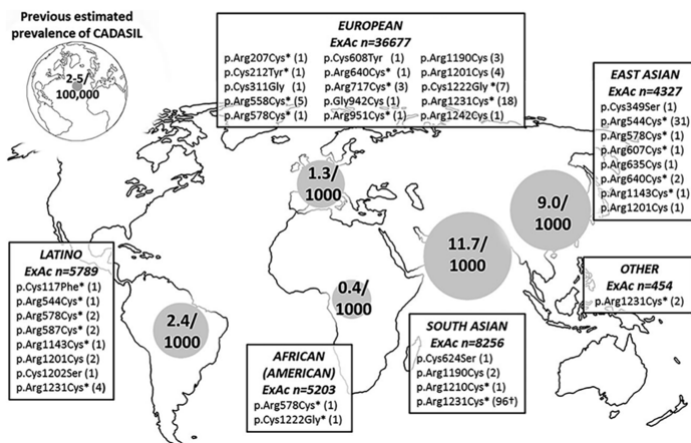


Figura 1. Representación gráfica de la frecuencia de mutaciones patogénicas de CADASIL según las poblaciones incluidas en la base de datos ExAC. Figura extraída de Rutten *et al.* (2016) (15).

*: mutaciones ya descritas en CADASIL: “†”: mutaciones descritas en tres ocasiones en homocigosis; (:): número de alelos.

Otros estudios, han querido determinar la frecuencia de CADASIL en poblaciones más específicas. Por ejemplo, estudiando varios exones en pacientes con pequeños infartos subcorticales, se encontró una frecuencia de CADASIL del 0.5% en <70 años, aumentando al 2% en aquellos con leucoaraiosis y una edad ≤60-65 años (17,18). Sin embargo, un estudio realizado en Asia, aun encontrando frecuencias similares, no encontraron diferencias significativas con respecto a controles (19). Finalmente, en 2018, estudiando todos los exones que codificaban para las repeticiones EGF (*Epidermal Growth Factor*)-like (EGFr), se halló una prevalencia del CADASIL del 12,5%, entre aquellos con pequeños infartos subcorticales y/o accidentes isquémicos transitorios (AIT) y/o sangrados intraparenquimatosos en ganglios de la base.

Resumiendo, se puede decir que, a medida que las técnicas de secuenciación genética han mejorado su sensibilidad a la hora de detectar mutaciones y se ha aumentado el número de exones a analizar, se han encontrado diferencias en la prevalencia de la enfermedad, hasta llegar a establecerla en alrededor de 3,4/1.000 individuos, y en cohortes específicas, como la de pacientes con pequeños infartos subcorticales, esta aumenta al 12,5%.

2.2. NOTCH3-Notch3

Notch3 pertenece a la familia de receptores transmembrana tipo I, llamada Notch, y cuyo nombre se debe a la presencia de una muesca (*notch*) en el ala de las moscas portadoras de una sola copia funcionante del gen (20). Esta familia de glicoproteínas transmembrana, se originaron a partir de duplicaciones génicas y mutaciones, resultando en un total de cuatro parálogos en mamíferos: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* y *NOTCH4* (21).

2.2.1. ESTRUCTURA

2.2.1.1. NOTCH3

NOTCH3 (NCBI Reference Sequence Database: NM_000435.3), se localiza en el cromosoma 19, concretamente en la banda 19p13.12, en la hebra negativa del ADN y la posición chr19:15159038-15200995 (GRCh38/hg38). Se encuentra constituido por un total de 33 exones. En la Figura 2 se representa el número de exones y las regiones que codifica en Notch3.

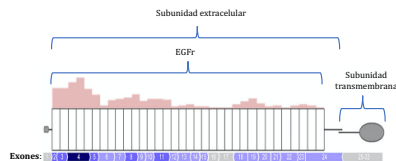


Figura 2. Exones de *NOTCH3* y regiones que codifica en Notch3. Las barras de color rosa representan la densidad del número de mutaciones descritas en la literatura. Figura extraída de Rutten *et al.* (2016) (15).

EGFr: repeticiones EGF (Epidermal Growth Factor)-like.

1.2.1.2. Notch3

Notch3, inicialmente se sintetiza como una glicoproteína constituida por 2.321 aminoácidos (Ensembl, <https://www.ensembl.org/index.html>). Posteriormente, puede sufrir una serie de modificaciones en el aparato de Golgi como la adición de una O-fucosa en los residuos serina o treonina de las EGFr, en un proceso mediado por la O-fucosiltransferasa. Este, se considera un control de calidad, pues sólo actúa en las EGFr

bien plegadas (22). Por otra parte, a algunos de los EGFr fucosilados, se les puede añadir N-acetilglucosamina, por una glicosiltransferasa llamada Fringe (23).

Antes de llegar a la membrana plasmática, y también en la vía trans-Golgi, se lleva a cabo la primera escisión proteolítica en la región S1, a través de una convertasa del tipo furina (24–26). Ello da lugar a un fragmento extracelular de Notch3 de unos 210 KDa, y otro fragmento con una porción extracelular, transmembrana e intracelular, de 97 KDa, que posteriormente se unen de forma no covalente, formando un heterodímero estabilizado por un ion calcio (25,27).

El receptor Notch3, puede dividirse en dos subunidades (Figura 3):

1) Subunidad extracelular (ECD). A su vez está compuesta por:

- Las 34 EGFr. Cada una de estas repeticiones presenta seis residuos cisteína, altamente conservadas evolutivamente, que forman tres puentes disulfuro, importantes para la estabilización estructural del receptor e interacción entre proteínas (20). Por otra parte, en esta región se encuentra el sitio de unión del ligando, localizado en las EGFr 10-11 (25,27,28). Y también se halla el sitio de unión del calcio, ion que estabiliza la molécula (27).
- La región reguladora negativa. Se encuentra tras el dominio de las 34 EGFr, y está constituida por tres motivos lin-12/Notch (LNR), que evitan la activación de Notch3 en ausencia de ligando (25,29,30).
- El dominio de heterodimerización.

2) Subunidad transmembrana. Constituida por una pequeña región extracelular, seguida del segmento transmembrana e intracelular (30):

- El dominio de heterodimerización. Necesario para su unión a la otra subunidad del receptor.
- El dominio intracelular (ICD), que está constituido por (25):
 - El dominio RAM (*recombination signal binding protein-1 for Jk* (RBP-Jκ)-*associated molecule*). Interviene en la potenciación de la señalización de Notch3, a través de la interacción con el factor

de transcripción CSL (*C promoter binding factor-1* -*CBF1*-, *Suppressor of hairless*, *Lag-1*), también conocido como RBP-J κ o CBF1.

- El dominio ANK: constituido por siete repeticiones cdc10/ankirina. Interviene en las interacciones proteína-proteína, incluida la interacción con CSL. La séptima repetición, junto con el dominio de transactivación, reclutan activadores de la transcripción como MAML (mastermind-like) y el complejo HAT (histone acetyltransferase).
- El dominio de transactivación.
- Dos señales de localización nuclear, que flanquean el dominio ANK (30).
- Un tramo rico en glutamina.
- El dominio PEST: rico en prolina, glutamato, serina y treonina. Interviene en la regulación de la vida media de la proteína (23).

Asimismo, Notch3 posee hasta cuatro zonas de escisión proteolítica: S1 y S2, que se encuentran en el dominio de heterodimerización, y S3 y S4, en la región transmembrana (31). La degradación del receptor tiene lugar vía lisosomal, a diferencia del resto de parálogos, que puede ser vía proteasoma-ubiquitina o lisosomal (32).

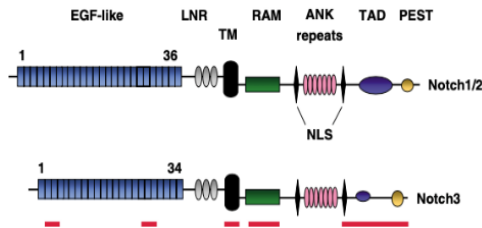


Figura 3. Organización estructural de Notch3, y su comparativa con la estructura de Notch1 y Notch2. Las barras rojas, bajo Notch3, indican las regiones con mayor diversidad entre ambas estructuras. Figura modificada de Bellavia *et al.* (2008) (33)

2.2.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE Notch

La señalización de los cuatro parálogos de Notch es equiparable, por lo que se trata de forma conjunta.

En mamíferos, existen cinco ligandos para la familia de Notch: Jagged1, Jagged2 (llamados Serrata1 y Serrata2 en *Drosophila*), Delta-like1, Delta-like3 y Delta-like4. En su conjunto, a estos ligandos se les conoce como DSL (Delta/Serrata/Lag-2) (23,25). En la Figura 4 se representa la principal vía de señalización de la familia de Notch (25).

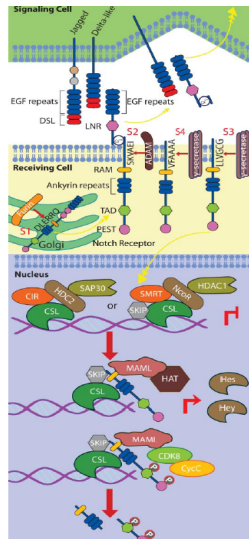


Figura 4. Vía de señalización de Notch. Inicialmente, tras su síntesis, Notch es escindido en la zona S1 en la vía trans-Golgi por Furina, expresándose, posteriormente, en la membrana celular como un heterodímero estabilizado con un ion calcio. Jagged y Delta son los ligandos mejor caracterizados de Notch. Contienen un dominio extracelular con EGFr y un dominio DSL. Jagged, además, presenta un dominio rico en cisteínas y un dominio factor de von Willebrand tipo C. La unión del ligando a Notch produce tres escisiones proteolíticas más, llevando a la liberación del ICD (en la figura NotchICD). El ICD se trasloca al núcleo donde se une a CSL para modificar la transcripción génica. Figura extraída de Niesen and Karsan (2007) (25).

En las células que expresan Fringe, Delta tiene preferencia por los receptores con la modificación llevada a cabo por esta, mientras que Jagged por los Notch sin esta modificación (23).

Con la unión del ligando a Notch, se cree que se produce un cambio conformacional, exponiéndose la zona S2 para su escisión proteolítica, llevada a cabo por la metaloproteínasa ADAM17 (también denominada TACE) y, dando lugar a la liberación del ECD (25). Seguidamente, el complejo γ -secretasa, constituido por preselinina 1, preselinina 2, Pen-2, Aph-1 y nicastrina, llevan a cabo las escisiones en S3 y S4. Finalmente, se libera el ICD, que se traslocará al núcleo para modificar la transcripción génica.

En el núcleo, Notch se une al regulador de la transcripción CSL, desplazando a los co-represores y reclutando co-activadores de la transcripción, que inducen la expresión de *HES* (*hairy enhancer of Split*) y *HEY* (*hairy/enhancer of split-related with YRPW motif*, o también denominado *HESR*, *CHF* o *HRT*) (26).

Otras proteínas, cuya expresión se ve modificada por Notch, son: la ciclina D1, p21, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), Nodal, Myc, PTEN, Efrina B2, y SMA (*smooth muscle α -actin*).

Asimismo, también se ha demostrado que, Notch3 regula la expresión de genes antiapoptóticos que modulan la vía de Fas; inhibiendo la transcripción de genes proapoptóticos y, aumentando la expresión de mediadores antiapoptóticos como c-FLIP, Bcl-2, y c-IAP-1 (34).

2.2.3. FUNCIÓN DE Notch3

Gene Ontology es la base de datos más grande que alberga la información sobre la función llevada a cabo por las distintas proteínas codificadas genéticamente. Para Notch3, podemos encontrar descritas las siguientes funciones biológicas:

- 1) Regulación positiva y negativa de la transcripción de la ARN polimerasa II.
- 2) Regulación de la transcripción dependiente del ADN.
- 3) Iniciación de la transcripción a través del promotor de la ARN polimerasa II.
- 4) Vía de señalización y regulación positiva y negativa de la transcripción de Notch.
- 5) Desarrollo de organismos multicelulares.

- 6) Regulación de los procesos del desarrollo.
- 7) Diferenciación celular y su regulación negativa.
- 8) Diferenciación neuronal y su regulación negativa.
- 9) Desarrollo del prosencéfalo: procesos encargados del desarrollo del prosencéfalo, que dará lugar al diencefalo (tálamo e hipotálamo) y telencefalo (hemisferios cerebrales).
- 10) Regulación positiva de la proliferación de la musculatura lisa. Promueve la diferenciación y maduración de las células del músculo liso (35).
- 11) Morfogénesis arterial: procesos involucrados en la generación y organización de las estructuras anatómicas de los vasos sanguíneos arteriales. Es indispensable para la diferenciación arterio-venosa (36).
- 12) Formación de los capilares del glomérulo.

2.2.4. EXPRESIÓN GENÉTICA

La expresión de *NOTCH3* en adultos se había restringido a las VSMC, el sistema nervioso central, algunas clases de timocitos, células T reguladoras y algunos tipos de células B (37).

Sin embargo, gracias a la mejora de las técnicas de secuenciación y análisis masivos de datos, junto con los esfuerzos realizados a nivel mundial para caracterizar la expresión genética de las diferentes proteínas, según el tejido estudiado, es posible conocer el perfil de expresión de diversas moléculas. *Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project* es una base de datos pública con información de expresión y regulación génica específica de tejido, en la que se estudiaron 54 tejidos sanos, en cerca de 1.000 individuos.

En la Figura 5 puede apreciarse la expresión, en sentido decreciente, de *NOTCH3*, según el tejido.

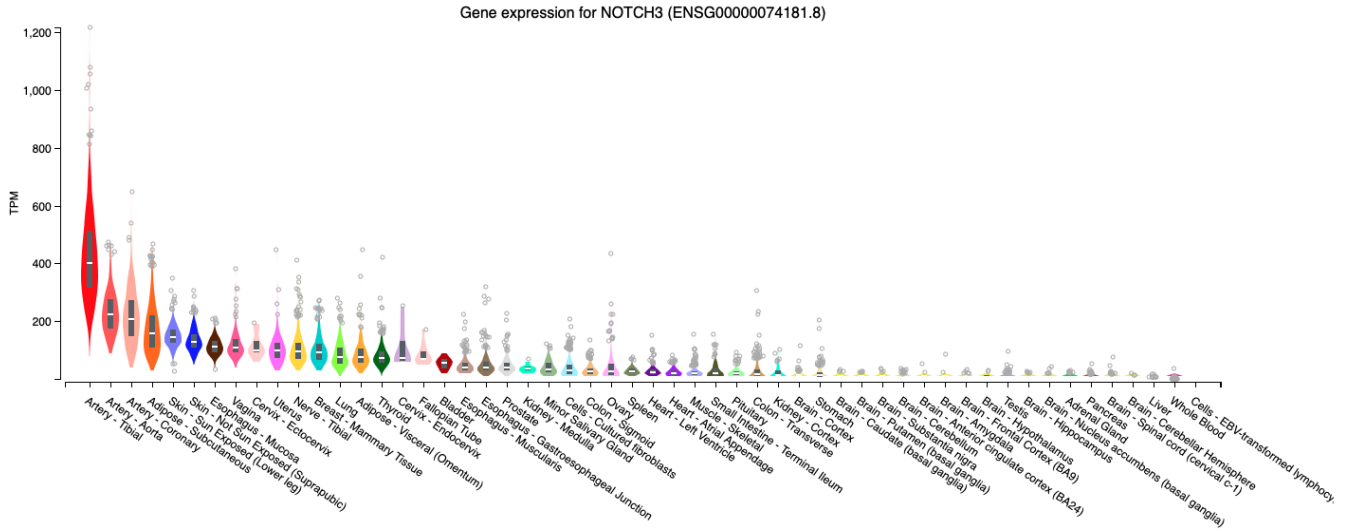


Figura 5. Perfil de expresión genética de *NOTCH3* por orden decreciente. Fuente: *GTEx Portal* (<https://gtexportal.org/home/gene/NOTCH3>)

2.2.5. MUTACIONES PATOGENICAS

Actualmente, se considera que las mutaciones patogénicas de *NOTCH3*, responsables del CADASIL, son aquellas que producen un cambio en el número de residuos cisteínas, dentro de las 34 EGFr, del dominio extracelular del receptor, y que están codificadas por los exones 2-24 (38).

La región con mayor acúmulo de mutaciones se encuentra en los exones 2-5, que codifican a los EGFr del 1-6 (Figura 2). Un estudio realizado en el año 2000 revelaba que, todas las mutaciones encontradas en *NOTCH3* producían cambios en el ADN citosina/timina, afectando a los dinucleótidos CpG. Se ha visto, en células de líneas germinales, que estos dinucleótidos presentan una gran hipermutabilidad y que además, están implicadas en procesos de metilación (38), pudiendo explicar el agrupamiento de las mutaciones causantes del CADASIL.

De la misma manera, el estudio de modelos 3D de los seis primeros EGFr, predecían que cada EGFr debería contener dos cadenas lámina beta, seguidas de una lámina más corta o una doble horquilla. Sin embargo, varias de las mutaciones descritas en la literatura, son incompatibles con este patrón de plegamiento (38,39).

2.3. ETIOPATOGENIA

El mecanismo exacto por el cuál las mutaciones encontradas en *NOTCH3*, producen los síntomas de CADASIL, es desconocido.

Múltiples esfuerzos se han realizado para intentar entender los mecanismos etiopatogénicos de esta enfermedad. Gracias al estudio de pacientes con CADASIL, modelos animales, células en cultivo derivadas de pacientes con CADASIL, y estudios *in silico*, se considera lo siguiente: el desencadenante principal de la cascada de eventos patológicos, es la aparición de un número impar de cisteínas en la región de las EGFr, que da lugar a la alteración de los puentes disulfuro, y la agregación de los ECD, tanto del Notch3 producido por el alelo mutado, como el del producido por el alelo *wild-type*.

La formación de estos agregados, que pueden evidenciarse de forma intracelular, membranosa y extracelular (estos últimos, los característicos GOMs), se cree que pueden estar implicados en la patogenia de la enfermedad. Diversos estudios han puesto de

manifiesto que pueden ocasionar una alteración de la autofagia, crear estrés en el retículo endoplasmático o atraer, secuestrar y/o activar, proteínas de la matriz extracelular, pudiendo adquirir estas un efecto tóxico (40).

Por otra parte, previo a la visualización de los GOMs vía microscopio electrónico, aparecen ya las características histopatológicas del CADASIL: alteración de las uniones celulares con la matriz extracelular y degeneración y pérdida de las células endoteliales, VSMC y pericitos.

Estudios en modelos animales, pusieron de manifiesto que, anterior a todas estas características histopatológicas, aparecía una vasorreactividad cerebral alterada, apuntando que la pérdida de VSMC y fibrosis de la pared arterial, no contribuían al inicio de la enfermedad en el ratón (41).

En los siguientes apartados, se describe, de forma somera, varios de los resultados de los estudios centrados en la etiopatogenia de la enfermedad.

2.3.1. ALTERACIÓN HISTOPATOLÓGICA

Desde el punto de vista histológico, los vasos sanguíneos están constituidos por:

- Túnica íntima: a su vez dividida en una capa de células endoteliales, la lámina basal, el espacio subendotelial, constituido por tejido conjuntivo laxo con células musculares lisas dispersas, y la lámina elástica interna.
- Túnica media: constituida por células musculares lisas, rodeadas de una membrana basal y una lámina elástica externa.
- Túnica adventicia: se trata de una capa de tejido conjuntivo, donde se encuentran los *vasa vasorum* y *nerva vasorum*.

Desde el punto de vista luminal, no queda claro si en el CADASIL existe una estenosis de la luz arterial, debido a los resultados contradictorios de los diferentes estudios que lo evaluaban (42–44). Lo que sí se ha encontrado, es un engrosamiento fibroso e hialino de la pared de las arterias pequeñas, capilares y vénulas, con depósito de fibronectina y fibrilina-1 en la túnica íntima y adventicia (44–48) y aumento de elastina en el espacio

subendotelial; todo ello, dando lugar a un aumento de la rigidez de la pared del vaso (43,49).

Por otra parte, en modelos animales de CADASIL, se demostró la presencia de trombosis en capilares y pequeños vasos, siendo más abundante en las ramificaciones de los capilares (50).

2.3.1.1. CÉLULAS ENDOTELIALES

En el CADASIL existe una pérdida de las células endoteliales que componen la túnica íntima, y las existentes se encuentran adelgazadas y con un aumento de los microfilamentos que se encuentran en el interior de su citoplasma (42,51). Además, modelos animales mostraron una pérdida de las uniones adherentes endoteliales (52).

2.3.1.2. CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

En el CADASIL, de forma característica, existe una pérdida de las VSMC (47,51,53), y las existentes, están adelgazadas y presentan múltiples procesos (4). Además, sus mitocondrias son anómalas y presentan inclusiones lisosomales (4,46,54).

La pérdida de estas VSMC, produce un *earthen pipe state*, en el que no es posible ni la vasodilatación ni la vasoconstricción, por lo que no existe autorregulación del flujo sanguíneo y la perfusión cerebral depende de la presión sistémica (47).

Por otra parte, existe una pérdida de las uniones celulares a la matriz extracelular adyacente, junto con alteraciones en el citoesqueleto (4,54,55). Estudios *in vitro* e *in vivo*, mostraron que la alteración de la unión célula-matriz extracelular es suficiente para desencadenar la muerte celular. El descenso de la subunidad $\beta 1$ de la integrina, observada en pacientes con CADASIL, podría contribuir a esta pérdida de adhesión a la matriz extracelular, y alterar la viabilidad celular; ya que las integrinas son responsables de la activación de señales de muerte celular ante la separación de las VSMC de su matriz extracelular (56).

2.3.1.3. PERICITOS

Los pericitos son células que se encuentran en los capilares sanguíneos, y que funcionalmente se corresponden con las VSMC. En el CADASIL, existe una pérdida de

las mismas y de las conexiones *peg-and-socket* (comunicaciones entre los pericitos y las células endoteliales), lo cual contribuye al daño endotelial; a la alteración de la barrera hematoencefálica, correlacionándose su grado de afectación con la reducción del número de pericitos; y afectación de la autorregulación (52,57–59).

2.3.1.4. AGREGACIÓN DE Notch3

Estudios *in vitro* han demostrado que, la presencia de receptores Notch3 alterados por las mutaciones patogénicas, incrementan la formación de complejos multiméricos entre sus ECD, y entre otras proteínas como los ECD de Notch3 producidos por alelos no mutados, Notch1 y Notch4 (60,61). Este mecanismo se cree que es debido a la afectación de los puentes disulfuro, y posibles cambios conformacionales de la molécula (60,62).

La formación de estos complejos, puede ser intracelular, en la membrana plasmática de las VSMC y pericitos (35,63); y de forma extracelular en los GOMs (64,65).

GOM

Los GOMs se localizan en vasos de pequeño y mediano tamaño, capilares y vénulas postcapilares (45,57,66), no sólo pertenecientes a la vasculatura cerebral, sino también a otros órganos, producto del carácter sistémico de esta arteriopatía (53,67). Su nombre se debe a su apetencia por el fijador utilizado para su evaluación por microscopía electrónica, el tetraóxido de osmio. Su formación se cree que puede ser producida por la alteración de la proteólisis en la zona S2, por una alteración en la ruta de eliminación del receptor o, porque se creen en el retículo endoplasmático, desde donde se trasladan al espacio extracelular (68).

Actualmente, no se cree que sean los desencadenantes del inicio de la cascada que da lugar al CADASIL, pues el daño endotelial y pérdida de las VSMC, preceden al depósito de los GOMs (43). Asimismo, tampoco existe correlación entre la presencia y/o el número de GOMs y la severidad del daño en las VSMC (51,55). Sí se ha correlacionado con la edad (55), encontrándose ausentes en los vasos fetales (69).

En la Figura 6 se representa la clasificación en cinco estadios, según el tamaño y grado de confluencia, de los GOMs (70).

Proteínas relacionadas con los agregados de Notch3

A continuación, se enumeran varias de las proteínas que se han encontrado relacionadas con los agregados extracelulares del ECD de Notch3:

- LTBP-1 (*latent TGF- β -binding protein*) (48).
- TIMP3 (40): pertenece a la familia de las TIMP, que son inhibidores de las metaloproteinasas. Se ha sugerido un aumento de su actividad, lo cual podría dar lugar a fibrosis vascular y afectar la regulación de la metaloproteinasas ADAM17 (40,71). En modelos animales, la disminución de Timp3 dio lugar a una mejora de la vasorreactividad, aunque no modificó el número de lesiones de sustancia blanca (72).
- Vitronectina (40): regula la adhesión celular, señalización y reorganización del citoesqueleto, y es capaz de modular el balance del sistema fibrinolítico y de la homeostasis de la matriz extracelular (40,71). En modelos animales, la disminución de vitronectina demostró una mejora en las lesiones de sustancia blanca (72).
- Varios estudios han puesto de manifiesto la presencia de beta-amiloide rodeando los GOM, en ausencia de una Enfermedad de Alzheimer concomitante (66,73,74).
- Otros componentes identificados en los GOMs son: clusterina, que es una chaperona extracelular, y endostatina, que es un fragmento proteolítico derivado de la cadena de colágeno $\alpha 1$ (XVIII).










Stage	tgk3 ^{+/+} 350 mouse	CADASIL patient	Description
I			<ul style="list-style-type: none"> - GOM deposits are smaller than normal width of BM - GOM deposits are round or elliptical - Minimal bulging of BM and minimal indentation of mural cell near GOM - GOM deposits are only slightly more electron-dense than surrounding extracellular matrix.
II			<ul style="list-style-type: none"> - GOM deposits are smaller than normal width of BM - GOM deposits are round or elliptical - Bulging of BM with indentation of mural cell near GOM - GOM deposits are electron-dense
III			<ul style="list-style-type: none"> - GOM deposits are longer than normal width of BM - GOM deposits are round or elliptical - Bulging of BM, and/or overall thickened BM (in human) - Bulging of BM with indentation of mural cell near GOM - Larger indentation of mural cell near GOM - GOM deposits are electron-dense
IV			<ul style="list-style-type: none"> - GOM deposits are longer than normal width of BM - GOM deposits are amorphous or have fibrous shapes - Bulging of BM, and/or overall thickened BM (in human) - Larger indentation of mural cell near GOM - GOM deposits are electron-dense
V	not observed in mice		<ul style="list-style-type: none"> - Two or more stage IV GOM deposits confluence into a patch of confluent GOM - Bulging of BM, and/or overall thickened BM (in human) - Mural cells can have two or more subtle indentations, reflecting two or more GOM deposits

Figura 6. Clasificación propuesta para los GOMs. La cabeza de la flecha señala a los GOMs, el asterisco la lámina basal, E: célula endotelial, M: célula mural. Figura extraída de Gravestijn *et al.* (2019) (70).

2.3.1.5. HIPERINTENSIDADES DE SUSTANCIA BLANCA

Una de las características principales en la RMN cerebral de los pacientes con CADASIL son las hiperintensidades subcorticales, que principalmente afectan a la sustancia blanca. Histopatológicamente, existe edema intramielínico con el subsecuente daño axonal, pérdida difusa de mielina, pérdida axonal, gliosis y dilatación de los espacios perivasculares (8,75–77).

Estas lesiones de sustancia blanca se deben a una etiología vascular, y no a un defecto primario en oligodendrocitos u otras células (41). Además, su extensión se ha correlacionado con el grado de apoptosis cortical en pacientes con CADASIL, pudiendo ser la apoptosis secundaria al daño en la sustancia blanca (78).

2.3.2. PROCESAMIENTO Y FUNCIÓN DE Notch3

A pesar de las mutaciones en *NOTCH3*, el receptor es capaz de expresarse en la membrana celular. En algunas ocasiones, los estudios han mostrado que en una proporción equiparable al *wild-type* (27,79), y en otras en una proporción menor (27,80–82). Respecto al procesamiento de Notch3, varios estudios mostraron una alteración en la zona de escisión S1 (79–81), frente otros que encontraron una correcta maduración (27,83).

Otro punto de controversia importante es en lo relativo a la función del receptor, en parte debido a la diferencia de los estudios con distintos modelos animales y mutaciones, ensayos inapropiados, o con poca sensibilidad (43).

2.3.2.1. HIPOFUNCIÓN

Mutaciones que afectan a la región codificante para la unión al ligando (EGFr 10-11), presentan una alteración en la unión de este y, por tanto, en la señalización de Notch3 (27,79).

Además, en los casos de homocigotos, se esperaría un fenotipo más severo, cosa que no ha sido así en los casos descritos (84,85).

2.3.2.2. NORMOFUNCIÓN

Varios de los estudios en los que se evaluaba la función de Notch3, debida a mutaciones que no afectaban al dominio codificado para los EGFr 10-11, encontraron una función correcta (27,79,83,86).

2.3.2.3. HIPERFUNCIÓN

Otros estudios vieron que existía un aumento en la actividad de Notch3 (43,81). Como posible explicación, en *Drosophila* se ha encontrado que la agregación de Notch3 (independiente de la unión del ligando), conlleva una activación aberrante de Notch3 (43).

2.3.3. ALTERACIÓN DE LA AUTOFAGIA

La autofagia es un sistema de reciclado en el que se controla la calidad de las proteínas y organelas celulares, evitando el envejecimiento y la muerte celular (87).

Indicios que sugieren una alteración de la autofagia en CADASIL, son los siguientes:

- El acúmulo de Notch3. Déficits en la vía autofago-lisosomal, producen agregación proteica, generación de especies proteicas tóxicas y acumulación disfuncional de organelas. Por una parte, parece que la agregación intracelular de Notch3 se debe a una alteración del tráfico intracelular y maduración o defectos lisosomales (88). Y, por otra parte, los agregados de Notch3, dificultan la eliminación del receptor (61,63,89).
- Un mayor número de autofagosomas, alteraciones en la fusión autofagosoma-lisosoma y en la degradación de autofagosomas en las VSMC que expresan el Notch3 codificado por el alelo mutado (88).
- Las alteraciones en el citoesqueleto (descritas en el apartado “2.3.1. Alteraciones histopatológicas”), que contribuyen a la alteración de la autofagia.
- La activación de la vía ERK/MAPK por Notch3, que incluye mTOR, que es un inhibidor de la autofagia, y cuyos niveles se han encontrado elevados en las VSMC (88).
- La alteración de moléculas involucradas en los procesos de autofagia: disminución en la subunidad β de las integrinas, las cuales regulan la actividad de

Notch3 mediando en su endocitosis dependiente de caveolina-1 (56), o aumento de ubiquitina (90).

- La presencia de macrófagos con aspecto similar al de las debidas a enfermedades por depósito (90), y disminución de la eliminación de restos de mielina, sugiriendo una microglía ineficiente (77).
- El aumento de la expresión de genes relacionados con el estrés del retículo endoplasmático en las VSMC de pacientes con CADASIL (91), pues el estrés del retículo endoplasmático altera los procesos de autofagia (92).

2.3.4. ALTERACIÓN MITOCONDRIAL

En secciones anteriores, se ha puesto de manifiesto que, histológicamente, las mitocondrias muestran una morfología alterada (93,94). También pueden mostrar un acúmulo subsarcolemal en el músculo esquelético (95) o presentar alteraciones funcionales. Casos esporádicos, han mostrado la existencia de una alteración en los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, con disminución de la actividad de NADH y/o COX, o incluso hallazgos sugestivos de miopatías mitocondriales (67,96).

Por otra parte, un estudio realizado en pacientes finlandeses con CADASIL, encontró un mayor número de polimorfismos en el ADN mitocondrial, con respecto a controles sin la enfermedad (97).

Cabe destacar que, el estudio del proteoma realizado en vasos cerebrales de pacientes con CADASIL respecto controles sanos, mostró una serie de proteínas disminuidas, principalmente mitocondriales, relacionadas con la fosforilación oxidativa (98).

2.3.5. HIPOPERFUSIÓN Y ALTERACIÓN DE LA VASOREACTIVIDAD

Varios estudios han puesto de manifiesto la existencia de una hipoperfusión cerebral, incluso en estadios tempranos de la enfermedad (99,100), así como una alteración en la autorregulación del flujo sanguíneo (101–103), que se ha relacionado con la atrofia cerebral (104) y el aumento de las WMH (105).

La hipoperfusión cerebral en la sustancia blanca de pacientes con CADASIL se ha correlacionado con la severidad de los síntomas y con la escala de Scheltens, que evalúa

el grado de alteración de la sustancia blanca (106,107). Sin embargo, ni en el córtex, ni en la sustancia blanca en menores de 30 años, se ha encontrado una hipoperfusión significativa (106,107).

En la autorregulación del flujo sanguíneo intervienen tanto las células endoteliales, cuya liberación de óxido nítrico produce vasodilatación, como las VSMC, que regulan el tono miogénico. Las modificaciones del calibre del vaso se producen en respuesta a:

- Cambios metabólicos como la presión parcial de O₂, CO₂ y pH.
- Cambios mecánicos a través de gradientes de presión transmural, y que depende de la integridad del citoesqueleto y la transmisión de fuerzas célula a célula a través de integrinas y la matriz extracelular (108). En el CADASIL existe una alteración de esta mecanotransducción, incluso previa a la aparición de los GOMs (108).
- Neurogénicos, gracias a la innervación autonómica.

Otras alteraciones relacionadas con la vasorreactividad son:

- Una respuesta vasoconstrictora aumentada para la angiotensina II y disminuida para la noradrenalina (109).
- Una pérdida parcial de respuesta a la acetazolamida (106).
- La respuesta tras la aplicación de CO₂ es contradictoria. En unos casos no se observó diferencias con respecto a controles sin CADASIL (99), y en otros casos, se encontró una respuesta alterada (110), y relacionándose con la discapacidad en los pacientes con esta enfermedad (47).

Asimismo, se ha observado que, de forma temprana, aparecen alteraciones en el *coupling* neurovascular (procesos biológicos involucrados en los cambios en el diámetro vascular, resultando en hiperemia durante la activación neuronal), el cual se ha visto también afectado en procesos como la demencia vascular y la migraña (111,112).

2.3.7. ALTERACIÓN COLINÉRGICA

La reducción de la producción de acetilcolina se ha relacionado con enfermedades degenerativas como la Enfermedad de Alzheimer, siendo los principales tratamientos para esta los inhibidores de la actividad de la colinesterasa. Por otra parte, en el núcleo

basal de Meynert es donde se encuentran más cuerpos neuronales de la vía colinérgica, cuyos axones alcanzarán el córtex a través del cíngulo y de la cápsula externa. Esta última región anatómica, característicamente afectada en pacientes con CADASIL. Por estos motivos, diversos estudios han querido evaluar la función colinérgica en el CADASIL.

Con diferentes aproximaciones, como la técnica de SAI (*Short-latency afferent inhibition*), que estudia el circuito inhibitorio del córtex motor, que depende principalmente de la actividad colinérgica, se ha puesto de manifiesto una disfunción de la inervación motora colinérgica en CADASIL (113) y que, lesiones subcorticales isquémicas pueden causar denervación cortical colinérgica en ausencia de patología primaria neocortical o de los núcleos basales (114–116). La mayor pérdida colinérgica en CADASIL ocurre en la corteza posterior cortical, dorsal frontal y occipital. El hipocampo, corteza entorrinal y la mayoría del neocórtex temporal, tienen una densidad de axones colinérgicos relativamente normal. Este patrón es opuesto a la demencia de tipo Alzheimer, donde la mayor denervación colinérgica se encuentra en el lóbulo temporal.

2.4. CLÍNICA

El estudio de grandes pedigrís de pacientes con CADASIL y la aparición de centros de referencia hospitalarios de carácter nacional para esta enfermedad, han posibilitado el estudio exhaustivo y la mejor caracterización clínica de la misma.

Los síntomas cardinales del CADASIL son: la migraña con aura, las alteraciones psiquiátricas, los pequeños ictus isquémicos subcorticales recurrentes de inicio precoz y la demencia (5). También pueden presentar parálisis pseudobulbar, crisis epilépticas, encefalopatía aguda reversible o alteraciones visuales. Otros síntomas más infrecuentes, y cuya relación con el CADASIL no está claramente definida como causal o casual, serían la afectación medular, del sistema nervioso periférico y muscular.

A continuación, se revisarán los estudios realizados sobre los síntomas cardinales del CADASIL.

2.4.1. MIGRAÑA

A diferencia de la población general, cuya frecuencia de migraña se estima en un 13%, siendo la migraña sin aura la más frecuente; en el CADASIL afecta a un 55-75% de los

pacientes (117–119), alcanzando el 82% en el caso de las mujeres (118). En un 68-84% de los casos de migraña, esta es con aura (118–120), y es más frecuente encontrar auras más prolongadas y complejas, como auras motoras, confusión, alteración de la conciencia o alucinaciones (12).

Normalmente, el primer episodio de migraña sin aura se produce entre los 16-30 años, así como en el caso de las mujeres con migraña con aura. Sin embargo, la edad de inicio de la migraña con aura en varones es más tardía, entre los 31-40 años (12).

Sorprendentemente, los pacientes con CADASIL y migraña, con respecto a los pacientes con CADASIL sin migraña, tienen un menor número de ictus (118). Asimismo, los pacientes con migraña con aura, además de ser más jóvenes, presentan una mejor función cognitiva y estado funcional, así como un menor número de microsangrados (CM) y un menor volumen de WMH en la RMN (119).

2.4.2. ALTERACIONES PSIQUIÁTRICAS

Hasta un 38-43% de los pacientes con CADASIL pueden presentar alteraciones psiquiátricas (119,121).

Si en la población general la prevalencia estimada de trastorno depresivo mayor se encuentra alrededor del 2-3% (122); en el CADASIL se ha visto que hasta un 18% de los pacientes presentan un trastorno depresivo mayor, y un 11% un trastorno depresivo menor, considerándose el CADASIL un modelo útil para el estudio de la depresión de etiología vascular (123).

Por otra parte, existe una alta prevalencia de apatía entre los pacientes con CADASIL (sobre todo en varones), llegando a alcanzar el 41%. Además, esta se ha asociado con el deterioro cognitivo y una mayor discapacidad (124).

Otros trastornos psiquiátricos que se han descrito en pacientes con CADASIL son el trastorno bipolar de inicio tardío (125,126) y la esquizofrenia (127,128). Por el momento, no hay estudios que atestigüen que estas patologías se asocien con mayor frecuencia en pacientes con CADASIL.

2.4.3. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

Hasta un 56-62% de los pacientes con CADASIL han presentado al menos un evento cerebrovascular (ictus isquémicos, ictus hemorrágicos o focalidad neurológica transitoria) (118,119,129). Como se ha mencionado anteriormente, la migraña en el CADASIL se ha asociado con un papel protector frente al número de ictus (118). Sin embargo, la presencia de CM se ha relacionado con la incidencia de infartos isquémicos cerebrales (129).

Los infartos cerebrales característicos del CADASIL son los pequeños infartos subcorticales, recurriendo en un 56% de los casos (119). La media de aparición del primer ictus son los 47 ± 10 años, siendo mayor en mujeres (49 ± 9 años) que en hombres (45 ± 10 años).

Hasta un 19-25% de los pacientes con CADASIL presentan lacunares incidentales, los cuales se asocian a la presión arterial sistólica y una mayor discapacidad y alteración cognitiva (130). Asimismo, el volumen total de infartos lacunares se ha relacionado con la atrofia cerebral (131).

Por otra parte, existen casos descritos de infartos cerebrales simultáneos, sin evidencia de una fuente cardioembólica, enfermedad carotídea oclusiva o estenosis intracraneal. Su origen se cree que es debido a fluctuaciones en la tensión arterial del paciente, que conlleva a una hipoperfusión e infartos en los territorios frontera (132–136).

Otros eventos cerebrovasculares descritos de forma más infrecuente son:

- La existencia de múltiples infartos intracorticales en un paciente con CADASIL (74).
- Infartos corticales, cuya relación con el CADASIL se desconoce si es casual o causal (137).
- Hemorragias intraparenquimatosas profundas y/o lobares (138–144), síntoma no frecuente en caucásicos, asociado al número de CM (138), pero que en asiáticos puede alcanzar hasta un 40% (145).

Por su similitud con la angiopatía amiloide cerebral, ambas presentando WMH y CM en la RMN craneal, es interesante remarcar que en el CADASIL no existe siderosis cortical, a diferencia de la angiopatía amiloide.

2.4.4. DETERIORO COGNITIVO

Su frecuencia se encuentra entre el 12-16%, llegando al 60% en mayores de 60 años, con una edad media de inicio de 55 ± 10 años (119,121,146), y mostrando un perfil de alteraciones cognitivas similar al de pacientes con SVD esporádica (147)

La función ejecutiva es el dominio cognitivo que más frecuentemente se ha visto alterado en pacientes con CADASIL, encontrándose afectado en el 88% de los pacientes con esta enfermedad con un rango de edad de 35-73 años (146). Otro de los dominios característicamente alterado, es la atención y velocidad de procesamiento de la información (VPI). Por ello, los test centrados en la evaluación de estas dos funciones, son especialmente útiles para la identificación temprana del deterioro cognitivo y monitorización del paciente con CADASIL (146,148).

A continuación, se listan los factores que se han relacionado con el deterioro cognitivo de los pacientes con CADASIL:

- El ser varón (121).
- La presencia de alteración de la marcha (149).
- El antecedente de ictus previo y, sobre todo, el número de lacunares (121,149–152).
- La presencia de forma severa de espacios perivasculares dilatados (EPD) en ganglios basales y sustancia blanca (153).
- La atrofia cerebral (151).
- La hipoperfusión cerebral (154).
- La difusión media en la sustancia blanca frontal y el fascículo mayor anteroposterior del cíngulo (que conecta el lóbulo frontal con regiones corticales más posteriores como la formación del hipocampo), que se correlacionan con los resultados de la función ejecutiva (155).

Sin embargo, no se encontró relación entre el deterioro cognitivo y el volumen de HS (149,151), ni las hiperintensidades confluentes en el tálamo (152). Sólo se demostró que

específicamente el volumen de WMH de la parte anterior del cuerpo caloso, se asociaba con una menor puntuación en la *Mattis Dementia Rating Scale* (MDRS) (150).

Respecto a los CM, los hallazgos son contradictorio, algunos estudios muestran que no se asocian con el deterioro cognitivo, y otros que sí (156) o cuando se localizan en el caudado o el brazo anterior de la cápsula interna (151).

2.5. HALLAZGOS DE LA NEUROIMAGEN EN PACIENTES CON CADASIL

Los *STandards for ReportIng Vascular changes on nEuroimaging* (STRIVE) fueron creados para facilitar la identificación de las manifestaciones de la SVD en la neuroimagen (157). Por su relevancia en el CADASIL, se describirán y comentarán:

- Las hiperintensidades de sustancia blanca de presumible origen vascular (WMH): se trata de una señal anormal, de tamaño variable, en la sustancia blanca, hiperintensa en imágenes de RMN ponderadas en T2, no debida a una cavitación.
- Hiperintensidades subcorticales (HS): aquellas que también afectan a los núcleos profundos de la base y al tronco-encéfalo.
- Espacio perivascular. Espacio relleno de líquido que sigue el curso de un vaso, circulando a través de la sustancia blanca y gris cerebral. La intensidad de la señal es similar a la del LCR. Su diámetro generalmente es <3 mm.
- Microsangrado cerebral (CM): son pequeñas áreas (normalmente de 2-5 mm, aunque pueden alcanzar los 10 mm) de señal de vacío. Se visualiza en secuencias de eco de gradiente ponderadas en T2 u otras secuencias sensibles a susceptibilidad paramagnética.

Para las consideraciones de los pequeños infartos subcorticales en el CADASIL, ver el apartado “1.4.3. Enfermedad cerebrovascular”

2.5.1. HIPERINTENSIDADES SUBCORTICALES EN CADASIL

Característicamente, en el CADASIL, existe una afectación de la sustancia blanca del lóbulo temporal, de la cápsula externa y el lóbulo de la ínsula; y las áreas menos afectadas, son la parte orbitobasal del lóbulo frontal y la región subcortical del lóbulo occipital (158,159). Según las series de casos, se puede encontrar una afectación de los ganglios de la base en el 100% de los pacientes (160,161) y del troncoencéfalo en un 45% (162). Localizaciones más infrecuentes serían el cuerpo calloso y el cerebelo (160,162–164).

A continuación, se listan los factores descritos en la literatura que se han correlacionado con la WMH: la edad (162,163,165), la presión diastólica (165), la APO E2 (166) y el número de EPD en el lóbulo temporal y el área subinsular (167).

Por otra parte, volúmenes mayores de WMH en el polo temporal y el giro superior frontal están asociados con formas más leves de la enfermedad, mientras que volúmenes mayores de WMH en los tractos piramidales o el fórceps minor están asociados con formas más severas (168), sugiriendo que el volumen global de WMH no es tan relevante como la zona afectada.

2.5.2. ESPACIOS PERIVASCULARES DILATADOS

Aproximadamente un 78% de los pacientes con CADASIL presentan EPD, localizándose un gran número de ellos en el lóbulo temporal y el área subinsular (167).

Los factores que se han asociado al número de EPD son, principalmente, la edad y el sexo (153). Sin embargo, ni los factores de riesgo cardiovascular, la discapacidad, el MMSE, el uso de antiplaquetarios o el número de CM, se han asociado al número de EPD (167).

2.5.3. MICROSANGRADOS CEREBRALES EN CADASIL

Alrededor del 35% de los pacientes con CADASIL presentan CM (129,156,167,169), siendo múltiples en el 66% de los casos (129). Su localización preferente es el tálamo, la región córtico-subcortical, la sustancia blanca y el tronco-encéfalo, siendo menos frecuentes en el cerebelo y el córtex cerebral (75,156,170).

Los factores de riesgo asociados al número total de CM son: la edad, la historia de ictus hemorrágico, la demencia, la incontinencia urinaria, el uso de estatinas, la hemoglobina

glicosilada y la presión arterial sistólica (156,169). La migraña, con o sin aura, supone un papel protector en los pacientes con CADASIL (156). Por otra parte, el uso de tratamiento antiagregante, el volumen de los lacunares y las WMH, no se han relacionado con la presencia de CM (169).

2.6. DIAGNÓSTICO

Hoy en día, el diagnóstico definitivo de CADASIL se establece a través del estudio genético de *NOTCH3*, con la detección de sus mutaciones patogénicas. Estas, afectan a los exones 2-24, que codifican para las EGFr, y que conllevan la aparición de un número impar de cisteínas en el receptor.

Debido al alto coste del análisis genético, y al largo tiempo necesario para su estudio e interpretación, desde la identificación del gen causante de la enfermedad en 1996, se han llevado a cabo múltiples esfuerzos para determinar la estrategia más eficiente para el diagnóstico de CADASIL, proponiéndose escalas para la selección de los pacientes para el análisis genético (171). Una clínica característica de CADASIL (migraña, alteraciones psiquiátricas, ictus y/o demencia a edades tempranas), junto con una RMN sugestiva, apoyará la selección de los pacientes para el diagnóstico genético. En aquellos centros con menores recursos económicos, el diagnóstico de CADASIL también puede realizarse a través de las biopsias de piel.

Con todo ello, se lleva a la práctica clínica una forma de racionalización adecuada de los recursos, flexibilizándose los grupos a los que realizar el estudio conforme avanzaban los años, de manera proporcional a la mejora de las técnicas diagnósticas y a su abaratamiento.

2.6.1. MARCADORES DE LA RMN PARA EL DIAGNÓSTICO DE CADASIL

Los estudios en pacientes con CADASIL, comparados con pacientes sin la enfermedad, han puesto de manifiesto que, la presencia de cinco o más hiperintensidades de sustancia blanca de >4 mm (categoría 3-6 de Scheltens), en el lóbulo temporal, tiene una sensibilidad del 89-95% y una especificidad del 80-86%, para el diagnóstico de CADASIL. De la misma manera, una afectación moderada/severa de la cápsula externa, presenta una sensibilidad del 93% y especificidad del 45%, para su diagnóstico (7,159).

2.6.2. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

El uso de la biopsia de piel como herramienta diagnóstica ha sido avalada por múltiples estudios (172–174). La presencia de los GOMs, evaluados por microscopía electrónica, tiene una especificidad del 100% para el diagnóstico de CADASIL (7).

Debido al carácter focal de estos depósitos, es necesaria la realización de secciones profundas y múltiples de la biopsia de piel, para minimizar la existencia de falsos negativos (175,176).

La aparición del anticuerpo frente al ECD de Notch3 (1E4), aumentó la sensibilidad del diagnóstico de CADASIL al 86-96%, con una especificidad del 95-100% (Figura 7)(177,178). Además, se apreció que la intensidad de la inmunotinción de las arteriolas con el anticuerpo no varía sustancialmente con la edad o el fenotipo del paciente.

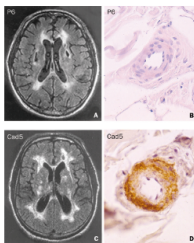


Figura 7. Visualización de la RMN craneal de dos pacientes y su biopsia de piel junto con la administración del anticuerpo frente a Notch3. En la imagen superior, el paciente no presenta CADASIL, y en su biopsia de piel no se aprecia tinción en la pared vascular para el anticuerpo de Notch3. En la imagen inferior, se trata de un paciente con CADASIL y teñido de forma abundante con el anticuerpo para Notch3. Figura extraída de Joutel *et al.* (2001) (177).

Comparando el uso del anticuerpo y la realización de un screening limitado (exones 3, 4, 11, y 18) en pacientes con sospecha de CADASIL, se puso de manifiesto que la biopsia de piel era más sensible para su diagnóstico.

1.6.2. DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Debido al alto coste económico del test genético, se intentó conocer si las mutaciones de *NOTCH3* se agrupaban en torno a determinados exones, y de esta manera concluir que, el análisis de parte del gen podía ser suficiente para llegar a un diagnóstico certero (179).

El análisis llevado a cabo por distintos grupos internacionales, demostró que existe una tendencia al agrupamiento de las mutaciones patogénicas de CADASIL en los exones 2-5 que codifican a los EGFr 1-6 (6,7,186,13,14,180-185).

Sin embargo, en 2016, analizando el número de mutaciones patogénicas de *NOTCH3* en el ExAC, se encontró que el 24 % de ellas afectaban al exon 11, el 12% al exon 4, otro 12% al exon 12, un 8% al 18 y con una frecuencia menor del 5%, los exones 6, 7, 14, 21, 23. Por tanto, existe una diferencia en la frecuencia de los exones afectados en los pacientes con CADASIL a lo largo de las diferentes poblaciones estudiadas y el ExAC (Figura 8).

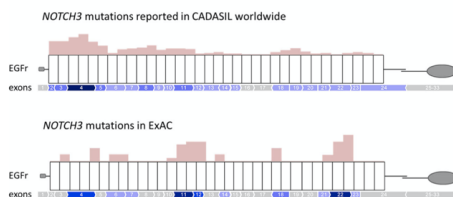


Figura 8. Comparativa de las mutaciones descritas a nivel mundial y las halladas en el ExAC. Las barras de color rosa representan la densidad del número de mutaciones. Figura extraída de Rutten *et al.* (2016) (15).

EGFr: repeticiones EGF (Epidermal Growth Factor)-like.

Por una parte, esto puede ser debido a un estudio incompleto de los exones de *NOTCH3*, con una preponderancia del análisis de los exones 3 y 4, que puede estar sesgando la frecuencia real de mutaciones. Por ello, actualmente el análisis genético tiende a realizarse, al menos en los exones 2-24.

Por otra parte, otro factor para tener en cuenta es la técnica para la detección de mutaciones. En muchos de los estudios iniciales se utilizaba SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), cuya sensibilidad para detectar mutaciones oscila entre el 80-85% (180). Posteriormente, la cromatografía líquida de alta eficacia (DHPLC) se planteó como una alternativa para detectar mutaciones que el SSCP no era capaz. Finalmente, la secuenciación Sanger y el NGS (*Next-Generation Sequencing*) permiten una detección altamente eficaz para un diagnóstico apropiado (186).

Asimismo, el factor geográfico y posibles efectos fundadores pueden haber contribuido a esta diferenciación. Pues en Reino Unido, Francia, España, Alemania, Holanda y norte

de Italia el exon más frecuentes es el 4 y conforme nos alejamos del centro italiano los más frecuentes pasan a ser el 10 y 11, en este país (6,7,186,13,14,180–185).

De la misma manera, estas diferencias observadas pueden ser consecuencia de analizar pacientes con un fenotipo más florido, de tal manera que aquellos pacientes paucisintomáticos como pudieran ser los incluidos en el ExAC, presentarían un perfil mutacional distinto, encontrándose casi todas las mutaciones agrupadas en torno a los dominios 14-16 y 29-31 de las EGFr.

2.7. PRONÓSTICO

Desafortunadamente, no existen herramientas pronósticas para el paciente con CADASIL. Una vez realizado el diagnóstico, se hace difícil poder indicarles qué clase de evolución tendrán. Pues pacientes con una misma mutación, aun perteneciendo a una misma familia o incluso siendo gemelos monocigotos, pueden evolucionar de forma diferente (187,188).

Estudios recientes han mostrado que, a pesar de la falta de asociación genotipo-fenotipo, podría existir una relación proteína-fenotipo. Aquellos pacientes con una mutación que afecte a las EGFr 7-34, tienen un fenotipo más leve que aquellos pacientes con mutaciones que afectan a las EGFr 1-6 (15,16). Como apoyo a esta hipótesis, en la literatura ya se habían descrito casos de pacientes con un debut de CADASIL a una edad mayor de 70 años, y que presentaban mutaciones que afectaban a las EGFr 7-34 (189,190).

Analizando a los pacientes con mutaciones que afectaban a las EGFr 1-6, con respecto a los que tenían mutaciones que afectaban a las EGFr 7-34, los primeros presentaban el primer ictus 12 años antes, tenían un mayor volumen de WMH y una menor supervivencia. Si la comparación se realizaba con respecto a las que afectaban a las EGFr 10-11 (sitio de unión del ligando), estas se asociaban con un mayor volumen de WMH (15,16). Otros estudios, mostraron que los pacientes con mutaciones que afectaban a este sitio de unión al ligando, presentaban un mejor perfil cognitivo, menor discapacidad, menor volumen de infartos lacunares y menor atrofia cerebral (27,79). Sin embargo, mutaciones que afectaban a las EGFr 10-11 se asociaban con un mayor volumen de

WMH; cabe mencionar que estudios previos han encontrado una gran variabilidad en el grado de lesión estructural bajo estas WMH (191).

De manera amplia se han descrito los factores asociados con las principales características clínicas y de neuroimagen de los pacientes con CADASIL (ver secciones “2.4. Clínica” y “2.5. Hallazgos de la neuroimagen en pacientes con CADASIL”).

Por otra parte, a continuación, se listan los marcadores asociados al deterioro o supervivencia del paciente con CADASIL, descritos en la literatura:

- La demencia y alteración de la marcha predicen una mayor discapacidad (149).
- El número de lacunares y la atrofia cerebral predicen el deterioro clínico (149).
- Los niveles de la cadena ligera de los neurofilamentos predecían la progresión y la supervivencia a los 17 años (192).

1.8. TRATAMIENTO

Actualmente, no existe ningún tratamiento curativo o modificador de la enfermedad. A pesar de ello, el tratamiento antiagregante es la norma, no existiendo evidencia que apoye la eficacia de este como profilaxis para los eventos isquémicos de los pacientes con CADASIL. También está controvertido el beneficio que pueda tener en estos pacientes el tratamiento fibrinolítico, al presentar un mayor riesgo de sangrado (193).

Asimismo, se dispone de tratamientos sintomáticos para el resto de los síntomas acompañantes. De forma específica, se ha encontrado que el ácido valproico puede ser una opción terapéutica para el dolor agudo de migraña en pacientes con CADASIL (194). Para la reducción del número de migrañas, la acetazolamida parece ser útil (195–197), así como el uso del antagonista del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (198). Hay que tener en cuenta que estas conclusiones provienen de estudios de casos clínicos.

Otros tratamientos cuya utilidad se ha evaluado en CADASIL:

- Atorvastatina. Se quiso demostrar, sin éxito, en 25 pacientes con CADASIL, la posibilidad de que esta estatina produjese cambios significativos en la hemodinamia cerebral a corto plazo (199).

- Donepezilo. En 2008 se publicó un ensayo clínico, multicéntrico, doble ciego, randomizado, en pacientes con CADASIL entre 25-70 años, y con deterioro cognitivo (200). No se encontró mejoría de la cognición evaluada por la escala V-ADAS-cog. Sin embargo, se encontró beneficio en varias medidas que evaluaban la función ejecutiva y velocidad de procesamiento de la información, cuya relevancia clínica fue cuestionada (201).
- Galantamina. El estudio realizado con este fármaco sólo fue completado por tres de los pacientes incluidos. Se apreció una leve mejoría o estabilización en los test conductuales y de sobrecarga del cuidador, sin efecto beneficioso en el deterioro cognitivo, y no habiendo sido bien tolerado el fármaco (202).
- Lomerizina. Este bloqueante de los canales del calcio, que dilata de forma selectiva los vasos cerebrales, se administró a una paciente con CADASIL, mejorando el rendimiento en sus test neuropsicológicos (203). No se dispone de ensayos clínicos que avalen su uso.
- SCF (*stem cell factor*) junto con G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*). En modelos animales de CADASIL, se vio que mejoraba la función cognitiva, disminuía la pérdida de las VSMC y el daño capilar, inhibía el depósito de GOMs, incrementaba la densidad de vasos sanguíneos, reducía la apoptosis en el parénquima cerebral, inhibía la pérdida de células madre o progenitoras neuronales y aumentaba la neurogénesis (204). Además, también se demostró que inhibía la trombosis en ratones con CADASIL (50).
- Tetrahydrobiopterina, cofactor esencial para la síntesis de óxido nítrico en las células endoteliales (205). Se quiso evaluar, sin éxito, si la suplementación con sapropterina, su análogo sintético, mejoraba la vasodilatación dependiente de endotelio en pacientes con CADASIL.
- Cerebrolisina. Es una combinación de péptidos y aminoácidos de bajo peso molecular que ha mostrado propiedades neurotróficas y que puede reducir el número de células apoptóticas tras la aplicación de estímulos de apoptosis. Su administración a linfocitos en cultivo de pacientes con CADASIL no mostró beneficio en el número de apoptosis (206).

Cabe destacar, por su intención de tratamiento específico de la enfermedad, el uso de la inmunoterapia y el *exon skipping* para el CADASIL.

1.8.1. INMUNOTERAPIA

El uso de anticuerpos frente al ECD de Notch3 demostró en ratones una mejoría de la disfunción cerebrovascular, aunque no modificaba las lesiones en la sustancia blanca (207). Cabe destacar que no se observó una disminución en los depósitos de ECD ni GOM. Los autores argumentaron que, el anticuerpo podría unirse a los ECD de Notch3 solubles, limitando un posible efecto tóxico.

1.8.2. EXON SKIPPING

En 2016 se llevó a cabo, por primera vez, un estudio para excluir el exon mutado de *NOTCH3* (*exon skipping*) y así evitar el efecto deletéreo de la aparición de un número impar de residuos cisteína en las EGFr, evitando así el acúmulo de ECD y la ulterior cascada de eventos patológicos (208).

A través de estudios *in silico*, descubrieron que la exclusión de exones en *NOTCH3* era técnicamente posible y que las proteínas obtenidas a partir de esta técnica presentaban un procesamiento normal, conservaban la capacidad de unirse al ligando, y este activaba al receptor.

Posteriormente, se estudiaron tres tipos de *exon skipping* (para los exones 2-3, 4-5 y 6) en células derivadas de las VSMC de pacientes con CADASIL. Todos mostraron una exclusión correcta del exon, una proteína en la que la mutación quedaba excluida, y con una correcta fusión de los EGFr. El procesamiento, unión al ligando, y actividad conseguidos era comparable al receptor *wild-type*. El estudio de la agregación de Notch3 no se pudo evaluar de forma fehaciente, pues ello precisa de estudios *in vivo*.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Tres hipótesis principales se plantearon en este trabajo de investigación:

- Las mutaciones en el gen *NOTCH3* que afectan a aminoácidos distintos de la cisteína, pueden ser potencialmente patogénicas y producir CADASIL, poniendo en entredicho la actual hipótesis etiopatogénica de la enfermedad.
- El análisis de la expresión génica en pacientes con CADASIL, permitirá hallar genes diferencialmente expresados y relevantes para la etiopatogenia de la enfermedad.
- La obtención de un modelo pronóstico para estimar la discapacidad, en pacientes con un ictus isquémico, será extrapolable a pacientes con un ictus isquémico y CADASIL. Este modelo podrá ser de utilidad en la práctica clínica diaria mediante su implementación a través de una aplicación web.

En base a estas hipótesis de trabajo, como **objetivo principal**, se planteó el estudio de la etiopatogenia del CADASIL a través del estudio de la expresión diferencial en las biopsias de piel de los pacientes con CADASIL respecto a controles sanos, a través de un *Genome-Wide Transcriptomic Study* (GWTS).

Por otra parte, como **objetivos secundarios**, se establecieron:

- La revisión sistemática en la literatura, de los estudios realizados en pacientes con sospecha de CADASIL y que fueran portadores de mutaciones que no afectasen al número de cisteínas.
- La creación de un modelo para predecir el grado de discapacidad en pacientes con ictus isquémico y testarlo en pacientes con CADASIL.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En base al objetivo principal y el objetivo secundario, el trabajo de investigación de la presente tesis puede dividirse en tres secciones. Dos de ellas enfocadas en profundizar en la etiopatogenia del CADASIL, y la restante enfocada en uno de los objetivos secundarios, la estimación del pronóstico de un paciente con un ictus isquémico y CADASIL.

4.1. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE PACIENTES CON SOSPECHA DE CADASIL Y MUTACIONES PUNTUALES EN *NOTCH3*, SIN AFECTACIÓN DEL NÚMERO DE CISTEÍNAS

Para la consecución de este apartado, se realizó una exploración bibliográfica en los principales metabuscadore: *PubMed*, *Google Scholar*, *EMBASE*, *LILACS*, *Trip Database*, y la *Cochrane Library*. De la misma manera, se revisaron las mutaciones ya publicadas de *NOTCH3* en *The Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Las palabras clave de búsqueda, utilizadas para obtener información sobre pacientes con la clínica característica de CADASIL y mutaciones puntuales que no afectasen a residuos cisteína del receptor, fueron: “CADASIL cysteine”, “*NOTCH3* cysteine”, y “*NOTCH3* polymorphism”.

En total se encontraron 224 artículos. Como criterios de selección, los artículos debían:

- Describir a los casos índices, puesto que siendo los sujetos de estudio se dispone de una mejor caracterización y, no añadiendo a sus familiares, se evitan sesgos en interpretaciones que podrían estar relacionados con un fenotipo familiar, más que con un fenotipo característico de la enfermedad.
- Los casos índices debían presentar la clínica característica del CADASIL: migraña, alteraciones psiquiátricas, ictus y/o demencia.
- Los casos índices debían presentar mutaciones puntuales que no afectasen al número de cisteínas.

Por otra parte, a continuación, se listan los motivos de exclusión de los artículos revisados de forma sistemática:

- Estudios donde se analizaban otras enfermedades o endofenotipos, como pacientes con WMH difusa.
- Estudios que incluían pacientes con mutaciones sin sentido, intrónicas, inserciones o deleciones. Su motivo de exclusión se debe a la posibilidad de que estas mutaciones puedan dar lugar a la modificación del número de cisteínas a través del acortamiento de la proteína (en el caso de las mutaciones sin sentido) (209,210) o, a través del cambio de la pauta de lectura (en el caso de las inserciones o deleciones) (211,212).
- Artículos en los que se describían mutaciones, que resultaban ser polimorfismos descritos anteriormente, y por tanto haciendo improbable su relación causal con el CADASIL.
- Dificultad en la identificación del caso índice.

Teniendo en cuenta los criterios de selección y de exclusión mencionados, la revisión sistemática finalmente incluyó un total de 18 artículos (Figura 9). De todos ellos, se recogió información epidemiológica, clínica, genética y de neuroimagen, así como si se había efectuado una biopsia de piel.

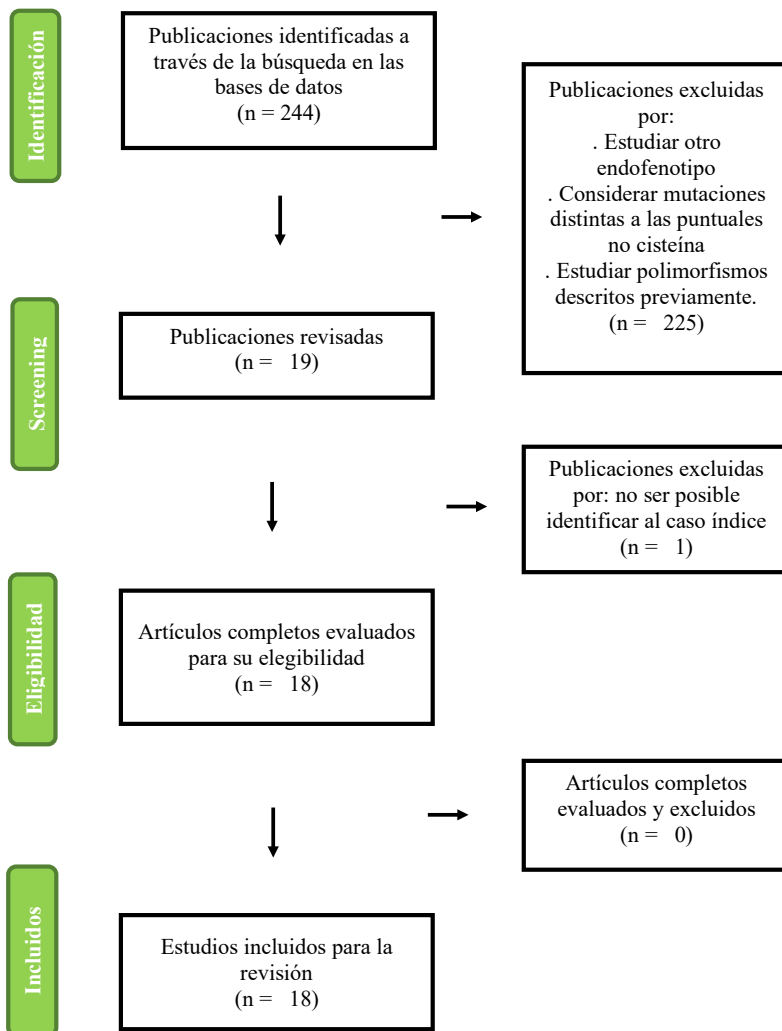
Las mutaciones revisadas se consideraron potencialmente patogénicas, si cumplían los siguientes criterios:

1. El paciente presentaba la clínica característica de CADASIL (migraña, alteraciones psiquiátricas, ictus y/o demencia).
2. El paciente presentaba WMH de forma difusa en la neuroimagen.
3. Se había realizado el análisis de los 33 exones de *NOTCH3* para descartar otras posibles mutaciones concomitantes.
4. La mutación presentaba una frecuencia del alelo minoritario (MAF) <0,1%. Debido a la baja prevalencia de CADASIL, se hace necesaria la exclusión de polimorfismos de baja frecuencia (MAF <5%), así como la de variantes

subpolimórficas (MAF del 0,1–1,0%). Para obtener la MAF se utilizó la base de datos ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>), que contiene información de 60.706 individuos, y la base de datos *1000 Genomes Project*, que contiene información genética de 1.000 individuos de diferentes etnias (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/>).

5. El paciente presentaba GOMs en la biopsia de piel, ya que estos depósitos se consideran patognomónicos del CADASIL.

Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de selección de los artículos.



4.2. ESTUDIO DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LAS BIOPSIAS DE PIEL DE PACIENTES CON CADASIL Y CONTROLES

Para la búsqueda de moléculas diferencialmente expresadas en pacientes con CADASIL, que puedan ser relevantes para la etiopatogenia de la enfermedad, o ser útiles como potenciales dianas terapéuticas, se realizó un estudio observacional caso-control. Inicialmente, se realizó un análisis masivo del ARNm (ARN mensajero) de las biopsias de piel de pacientes con CADASIL y sujetos control, con la técnica de microarrays (*Genome-Wide Transcriptomic Study* -GWTS-). Posteriormente, los ARNm diferencialmente expresados de forma más significativa se evaluaron con la técnica de qRT-PCR (*real-time quantitative reverse transcription protein chain reaction*) en una nueva cohorte de pacientes con CADASIL y controles.

4.2.1. PARTICIPANTES

Los participantes para el estudio fueron seleccionados del registro “CADAGENIA”. Este es un registro prospectivo iniciado en 2017, donde se incorporaron de forma consecutiva pacientes con mutaciones en el gen *NOTCH3*. Los participantes del registro provenían principalmente del Hospital de la Vall d’Hebron y el Hospital del Mar, Barcelona. Asimismo, controles sanos sin mutación conocida en *NOTCH3* fueron también incluidos.

En el registro se anotaron los datos epidemiológicos, de análisis de sangre, de neuroimagen (principalmente RMN), test neuropsicológicos y biopsia de piel. Ver sección “4.2.2. Variables”.

Para el estudio del ARNm diferencialmente expresados, los criterios de inclusión y exclusión para casos y controles se encuentran recogidos en la Tabla 1.

Como criterio adicional para el estudio de GWTS, los pacientes con CADASIL y los controles debían ser consanguíneos. Criterio no requerido para el estudio de replicación mediante qRT-PCR.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión para casos y controles del estudio de ARNm diferencialmente expresados.

	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Casos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ser mayor de edad (>18 años) 2. Presentar una mutación que produzca un número impar de cisteínas en los EGFr 3. Disponer de biopsia de piel 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ser menor de edad (<18 años) 2. No presentar una mutación que produzca un número impar de cisteínas en los EGFr 3. No disponer de biopsia de piel
Controles	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ser mayor de edad (>18 años) 2. Acceder a la realización de la biopsia de piel 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ser menor de edad (<18 años). 2. Presentar mutaciones en el gen <i>NOTCH3</i> 3. No disponer de biopsia de piel

4.2.2. VARIABLES

De las variables clínico-epidemiológicas del registro “CADAGENIA”, se escogieron aquellas consideradas más relevantes por su asociación con los síntomas observados en el CADASIL:

- Edad.
- Sexo.
- Factores de riesgo cardiovascular como:
 - Hipertensión (HTA), definida como presión arterial sistólica >140 mmHg o diastólica >90 mmHg, obtenida en dos medidas distintas, tomada en dos días diferentes; o estar bajo tratamiento hipotensor.
 - Diabetes mellitus (DM), definido como una glicemia basal plasmática ≥ 126 mg/dL, glicemia ≥ 200 mg/dL a las 2 horas de la sobrecarga oral de glucosa, una HbA1c $\geq 6.5\%$ o estar con tratamiento antidiabético.

- Dislipemia (DLP), definida como la elevación de los niveles de LDL, del colesterol total, la disminución de los niveles de HDL o estar bajo tratamiento hipolipemiente.
- Hábito tabáquico.
- Tipo de mutación.

El perfil cognitivo se determinó en cinco de los casos incluidos en el estudio de expresión diferencial con la técnica de qRT-PCR, a través de un estudio neuropsicológico completo. Para la evaluación cognitiva global se empleó el *Montreal Cognitive Assessment* (MOCA). De forma específica se estudiaron los siguientes dominios cognitivos:

1. Memoria verbal. Valorada mediante el estudio de la memoria inmediata y verbal con la sección IV (memoria lógica) y sección VII (aprendizaje asociado) respectivamente, de la *Wechsler memory scale-III* (WMS-III).
2. Memoria de trabajo. Valorada con la sección de dígitos (en orden directo e inverso) de la *Wechsler Adult Intelligence Scale* (WAIS-III).
3. Función ejecutiva. Valorada mediante el estudio de las fluencias verbales fonéticas (con las letras “P”, “M” y “R”) y semánticas (animales), el *Stroop Word and Color test* (número de palabras y colores) y el *Trail Making Test part B* (TMT-B) (tiempo de ejecución).
4. Atención y velocidad de procesamiento de la información (VPI). Valorada mediante el *Symbol Digit Modalities Test* (SDMT), *Stroop Word and Color test* (número de palabras y colores) y el *Trail Making Test part A* (TMT-A) (tiempo de ejecución).
5. Velocidad motora y destreza. Valorada mediante el *Purdue Pegboard test*, teniendo en cuenta la mano dominante, la no dominante y ambas.
6. Habilidad visuoespacial. Valorada mediante la sección de diseño de cubos de la WAIS-III.

Las puntuaciones obtenidas en los test neuropsicológicos fueron normalizadas y ajustadas por la edad y el nivel educacional medido en años, siguiendo los datos normativos

españoles (213–215). En todos los casos, un Z-score más alto indica un mejor rendimiento. Así mismo, teniendo en cuenta la media ajustada de cada prueba, se calcularon los índices cognitivos por cada dominio evaluado.

4.2.3. EXTRACCIÓN DEL ARN

A cada participante del estudio se le realizó un punch de 6 mm de diámetro localizado en la axila, región apropiada al tratarse de una zona poco fotoexpuesta (64). El ARN se extrajo con el kit *RNeasy® Plus Micro* (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, previa homogeneización del tejido con el *TissueRuptor* (Quiagen).

4.2.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE *MICROARRAYS* (GWTS)

Para la realización del estudio GWTS mediante la técnica de *microarrays*, se emplearon 10 ng del total del ARN extraído de las muestras de cada participante del estudio. Para evaluar la calidad y concentración del ARN se realizó una electroforesis capilar con el NanoChip (Bioanalyzer 2100, Agilent). Para evaluar la integridad del ARN se analizó el RIN (RNA integrity number), seleccionando aquellos con un valor superior a 4.5.

Posteriormente, del total de ARN extraído, se generó el ADN complementario de cadena única (ADNc), con el kit *GeneChip WT Pico Reagent* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit hace posible generar perfiles de expresión a partir de tan solo 100 pg de ARN. A continuación, el ADNc purificado se fragmentó, etiquetó e hibridó en los *arrays* utilizando el kit *GeneChip Hybridization, Wash and Stain* (Thermo Fisher Scientific).

4.2.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE qRT-PCR

Para el estudio de expresión mediante qRT-PCR, se escogieron los dos ARNm diferencialmente expresados de forma más significativa del GWTS (valor de $p < 1,0 \times 10^{-3}$). Adicionalmente, se seleccionaron otros dos ARNm de entre los 15 diferencialmente expresados de forma más significativa, y que tuviesen relación con la isquemia neuronal y, por tanto, pudiesen ser relevantes en una patología como el CADASIL. Para efectuar esta selección, se realizó una búsqueda bibliográfica mediante el portal de *PubMed*

empleando los términos “(ischemi*[Title/Abstract]) AND *gene*[Title/Abstract]”, y así encontrar asociaciones entre los ARNm y la isquemia neuronal.

De los 15 ARNm diferencialmente expresados de forma más significativa, tras la búsqueda con los criterios anteriormente mencionados, se encontraron relacionados con la isquemia neuronal los siguientes:

- *CAMK2G* (216,217).
- *E2F4* (218,219).

De esta manera, para el estudio de expresión diferencial con la técnica de qRT-PCR, se analizaron: *BANP*, *PDCD6IP*, *CAMK2G* y *E2F4*.

La medición de los niveles de ARNm se obtuvo mediante la técnica de qRT-PCR, que utiliza sondas fluorogénicas TaqMan® (Tabla 2) en una *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Para la normalización de los datos se utilizó la expresión del gen *PPIA* (Peptidylprolyl Isomerase A), utilizado previamente en otros estudios de expresión génica en el ictus (220,221).

Tabla 2. Sondas TaqMan® utilizadas en el estudio de expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR.

Gen	Nombre del gen	Sonda
<i>BANP</i>	BTG3 associated nuclear protein	Hs0099999904_m1
<i>PDCD6IP</i>	Programmed cell death 6 interacting protein	Hs00994345_m1
<i>CAMK2G</i>	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II gamma	Hs00968809_mH
<i>E2F4</i>	E2F transcription factor 4	Hs00608098_m1
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl Isomerase A	Hs0099999904_m1

La técnica de qRT-PCR se realizó siguiendo el protocolo del kit de PCR de TaqMan®, en el que se emplean 20 µl de la mezcla de PCR, obtenida con:

- 5 µl de ADNc.
- 10 µl 2x TaqMan® Universal PCR Master Mix (P/N: 4304437, Applied Biosystems).

- 1 μ l de la sonda del ARNm objeto de estudio.
- 4 μ l de agua.

Las reacciones se realizaron por triplicado para cada muestra, en dos placas de 384 pocillos. Se incubaron a 50°C durante dos minutos y a 95°C durante diez minutos, seguidos por 40 ciclos a 95°C de 15 segundos y 60°C durante un minuto (222). El análisis se obtuvo con la aplicación *RQ App* de *Thermo Fisher Connect* (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/digital-science/thermo-fisher-connect.html>), obteniéndose la cuantificación relativa (RQ) entre los ciclos de cada muestra, respecto a una muestra control que servía de calibrador.

Los principales controles de calidad de la técnica de qRT-PCR proporcionados por la aplicación *RQ App* de *Thermo Fisher Connect* y su manual “Guide to performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” (223), tenían en cuenta si:

- El nivel de confianza para el número de ciclos (C_q) era <0.8 .
- Se detectaba un ΔR_n mínimo, debido a un ΔR_n de base <35 . El ΔR_n se define como la magnitud de la señal de fluorescencia normalizada, generada en cada ciclo durante la amplificación por PCR.
- La desviación estándar (SD) del C_q (número de ciclos) entre las réplicas era >0.3 .
- El límite superior de C_T (número de ciclos límite) era 40.
- La señal de fluorescencia excedía la capacidad de detección de la máquina.
- El C_q del pocillo se desviaba de forma significativa de los valores de las réplicas asociadas, y por tanto era considerado un *outlier*.

4.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos y bioinformáticos se utilizaron *scripts* personalizados con el lenguaje de R, versión 3.6.0 (R Core Team, 2019), utilizando los paquetes de Bioconductor.

Dentro del preprocesamiento de los datos obtenidos con el estudio de expresión diferencial del ARNm, mediante la técnica de microarrays, se realizó como control de calidad, la exploración de los datos de manera visual. Posteriormente, mediante el RMA (*Robust Multi-array Average algorithm*), se realizó la corrección del ruido de fondo, la normalización de los datos y la *summarization*. Este último integra los valores de todas las sondas correspondientes a un mismo gen.

A continuación, se eliminaron de los análisis varias sondas que detectaban los niveles de ARNm de varios genes, debido a que:

- Su SD ocupaba un percentil <65. Es decir, la expresión de ese ARNm tenía poca variabilidad entre los distintos individuos.
- No poseían un identificador conocido en *Entrez Gene* (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene).
- No tenían anotaciones válidas en la base de datos *Gene Ontology* (<http://geneontology.org/>).

Finalmente, un total de 6.485 ARNm fueron evaluados mediante una regresión lineal Bayesiana, teniendo en cuenta la dependencia entre las muestras, puesto que casos y controles eran consanguíneos. Tratándose de un análisis con múltiples comparaciones, para disminuir la tasa de falsos positivos, es necesaria la corrección del valor de p. En este caso, el método empleado para tal fin, fue el de Benjamini y Hochberg (224), considerando estadísticamente significativos los genes con un valor de p ajustado <0,05.

Para el estudio de expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR en la cohorte de replicación, se seleccionaron los dos ARNm diferencialmente expresados de forma más significativa (valor de $p < 1,0 \times 10^{-3}$), y otros dos, de entre los 15 diferencialmente expresados de forma más significativa, asociados a isquemia neuronal.

Por otra parte, puesto que la inclusión de valores *outliers* puede llevar a interpretaciones erróneas (225), se realizó un box plot con la función “ggbetweenstats” del paquete “ggstatsplot” para la identificación visual de los mismos. La prueba Q de Dixon, empleada mediante la función “dixon.test” del paquete “outliers”, permitió identificar si

los *outliers* observados gráficamente, eran estadísticamente significativos y, por tanto, esas muestras debían excluirse del análisis.

De igual manera que en el estudio de expresión diferencial mediante la técnica de *microarrays*, los resultados obtenidos con la técnica de qRT-PCR hubieron de ser corregidos debido a las múltiples comparaciones, en este caso por el método de Bonferroni, el cual es más estricto que la corrección por el método de Benjamini y Hochberg. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p ajustado $<0,05$.

La valoración de las diferencias estadísticamente significativas, entre las distintas variables de los participantes de los estudios, se realizó con: el test exacto de Fisher para variables categóricas y, el test de la U de Mann-Whitney para variables numéricas u ordinales. Para estudiar la correlación lineal entre variables numéricas normales y homocedásticas, se utilizó la prueba de Pearson.

Para el estudio de normalidad de las variables se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk con la función “shapiro.test” del paquete “stats” de R, y para estudiar la homocedasticidad la prueba de Breusch-Pagan, con la función “bptest” del paquete “lmtest”.

4.2.7. PERFIL DE EXPRESIÓN

Para determinar el perfil de expresión de los ARNm significativos obtenidos en el estudio de expresión diferencial, mediante la técnica qRT-PCR, se empleó el *GTEx Portal* (<https://gtexportal.org/home/>) y, para la expresión por tipo celular cerebral, el *Single-nuclei Brain RNA-seq expression browser* (<http://ngi.pub/snuclRNA-seq/>).

4.2.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio fue aprobado por el comité ético local. Se facilitó un consentimiento informado a cada participante antes de cualquier procedimiento y fue firmado por él mismo o su representante.

4.3. CREACIÓN DE UN MODELO PRONÓSTICO PARA ESTIMAR LA DISCAPACIDAD AL TERCER MES DE HABER PADECIDO UN ICTUS ISQUÉMICO Y SU EFICACIA EN PACIENTES CON CADASIL

Para la consecución de este tercer objetivo, se creó un modelo pronóstico a partir de una cohorte de descubrimiento, con pacientes que habían presentado un ictus isquémico y, posteriormente, se validó en una cohorte independiente de pacientes con los mismos criterios de inclusión y exclusión. Finalmente, se comprobó la eficacia del modelo en una muestra de pacientes con CADASIL e ictus isquémico.

4.3.1. PARTICIPANTES

4.3.1.1. COHORTE DE DESCUBRIMIENTO

Los participantes para la creación del modelo, y que constituyen la cohorte de descubrimiento, fueron seleccionados a partir del registro “BASICMAR”. Este es un registro prospectivo que recoge la información clínico-epidemiológica de pacientes con un ictus, atendidos en el Hospital del Mar desde el año 2005 (226).

4.3.1.2. COHORTE DE REPLICACIÓN

El modelo pronóstico obtenido se replicó en una nueva cohorte independiente de 378 pacientes con un ictus isquémico, atendidos en el Hospital de la Vall d’Hebron de Barcelona. Esta cohorte incluye pacientes admitidos en urgencias entre agosto del 2012 y agosto del 2015.

4.3.1.3. COHORTE CADASIL

Se seleccionaron todos los pacientes con CADASIL que habían padecido un ictus isquémico y que no hubieran sido tributarios de tratamiento recanalizador, de la base de datos “BASICMAR” (desde enero 2005 hasta octubre 2019) y del Hospital de la Vall d’Hebron (desde agosto del 2012 hasta noviembre 2019), y de los cuales se dispusiera de información de las variables del modelo.

4.3.1.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LA COHORTE DE DESCUBRIMIENTO Y DE LA COHORTE DE REPLICACIÓN

A continuación, se listan los criterios de inclusión de los participantes:

- Ser mayor de edad (>18 años).
- Presentar un ictus isquémico.
- Acudir a urgencias durante las primeras 24 h desde el inicio de los síntomas.
- No ser tributario de tratamiento recanalizador.

4.3.3.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE LA COHORTE DE DESCUBRIMIENTO Y DE LA COHORTE DE REPLICACIÓN

A continuación, se listan los criterios de exclusión de los participantes:

1. Pacientes sin información disponible sobre el *modified Rankin Score* (mRS) al tercer mes, puesto que no se podrían añadir al modelo, al carecer del valor de la variable que se quiere predecir.
2. Pacientes ya dependientes previamente al ictus (mRS >2).
3. Accidentes isquémicos transitorios (AIT), puesto que estos pacientes no presentan cambios en el mRS al tercer mes, debido a la recuperación *ad integrum* del evento vascular.
4. Pacientes sometidos a tratamiento recanalizador. La variabilidad en la respuesta al tratamiento de la fase aguda del ictus, r-tPA (activador recombinante del plasminógeno tisular) endovenoso, trombólisis intraarterial o trombectomía mecánica, dificulta la estimación del estado funcional del paciente a los tres meses del evento vascular. Para conseguir una muestra más homogénea y, por tanto, obtener un modelo más reproducible, estos pacientes fueron excluidos. Asimismo, el uso del tratamiento fibrinolítico en pacientes con CADASIL es controvertido debido al mayor riesgo hemorrágico de estos pacientes (227), y al desconocerse el mecanismo concreto por el cual se producen los pequeños infartos subcorticales característicos de esta enfermedad.

4.3.3.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio fue aprobado por el comité ético local de cada hospital participante en el estudio. Se facilitó un consentimiento informado a cada participante y fue firmado por él mismo o su representante (código 2005/2088/I y 2008/3083/I para la cohorte de descubrimiento, PR(AG)157/2011 para la cohorte de replicación).

4.3.2. VARIABLES

Se efectuó una búsqueda bibliográfica exhaustiva para identificar aquellas variables asociadas con el pronóstico al tercer mes de un paciente con un ictus isquémico, y que pudieran ser recogidas durante las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas. Las palabras clave utilizadas en el portal *PubMed* fueron: “prognosis AND stroke AND model AND outcome”. Se encontraron un total de 2.872 artículos. Teniendo en cuenta los artículos hallados y, las variables recogidas en el registro “BASICMAR”, se seleccionaron doce para los análisis posteriores: edad, sexo, HTA, DM, DLP, fibrilación auricular (FA), glicemia inicial, NIHSS inicial, mRS inicial, hemoglobina glicosilada, proteína C reactiva (PCR) y dímero D.

El estado funcional al tercer mes se evaluó a través del mRS. Esta escala fue diseñada para valorar la discapacidad tras un ictus, con un rango de 0-6:

- 0: sin síntomas.
- 1: sin discapacidad significativa a pesar de los síntomas.
- 2: discapacidad ligera.
- 3: discapacidad moderada.
- 4: discapacidad moderada-severa.
- 5: discapacidad severa.
- 6: muerte.

El mRS a los tres meses se obtuvo a partir de una visita presencial con un neurólogo vascular en el caso de la cohorte de descubrimiento. Si el paciente se ausentaba a la visita

médica, la información se adquiría a través de la historia clínica electrónica o mediante contacto telefónico con el paciente, un familiar o su cuidador. En el caso de la cohorte de replicación, esta variable fue evaluada por un médico especialista mediante una visita presencial, o una llamada telefónica protocolizada. En ambas cohortes el examinador era ciego al resultado del modelo.

En esta sección de la presente tesis, se pretende predecir la independencia o dependencia de un paciente con CADASIL a los tres meses de haber padecido un ictus isquémico. Por tanto, para la evaluación final del modelo se dicotomizó el mRS obteniendo: paciente independiente aquél con un mRS <3 y paciente dependiente si el mRS era >2 (228).

4.3.3. WEB-TOOL

Para facilitar el uso de este modelo pronóstico en la práctica clínica diaria, se creó una aplicación web (<https://cadasil.shinyapps.io/parsifal/>). Se generó empleando el lenguaje de R y siguiendo las instrucciones del paquete “shiny” (<http://shiny.rstudio.com>) (229).

4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos y bioinformáticos se utilizaron *scripts* personalizados con el lenguaje de R, versión 3.4.2 (R Core Team, 2019), utilizando los paquetes de Bioconductor.

4.3.4.1. CREACIÓN DEL MODELO

Para la creación de este modelo pronóstico se utilizó una aproximación ordinal (230). La puntuación y estimación del mRS al tercer mes, para cada paciente, se halló teniendo en cuenta la ecuación generada con los coeficientes de la regresión logística ordinal multivariable.

Para la selección de las variables en el modelo, se utilizó el método de selección *forward stepwise*. El orden de introducción de las mismas, se realizó teniendo en cuenta el valor de p de la regresión logística ordinal univariada, entre las variables de interés y el mRS al tercer mes, testando primero las que poseyeran una mayor asociación estadística (231). Si alguna de las variables del modelo perdía su asociación significativa con la variable a estimar, al añadir una nueva variable, la no significativa era retirada del modelo.

Aquellas variables de cuyos datos no se disponía información para >10% de los pacientes, no fueron incluidas en el modelo, puesto que los resultados posteriores podrían verse sesgados (232).

Para la realización de la regresión logística ordinal multivariable se empleó la función "polr" del paquete "MASS" (233). Para cada nivel de la variable ordinal a estimar (mRS al tercer mes), esta función vuelca los límites de la puntuación del modelo. En este caso, esta función establece siete niveles de 0 a 6, clasificando a los pacientes según su puntuación en los diferentes grupos de mRS estimado.

La aplicación de una regresión logística ordinal, precisa el cumplimiento del supuesto que establece que, el riesgo de cada par de niveles de la variable debe de ser proporcionado, paralelo, y no significativamente diferente. Con el fin de evaluar este supuesto, se utilizó la prueba de Brant, con la función "brant" del paquete "brant" (234).

4.3.4.2. EVALUACIÓN DEL MODELO

La evaluación del modelo obtenido tuvo en cuenta los criterios propuestos por Sim *et al.* (235):

- 1) Discriminación: precisión en la clasificación. Se estimó calculando el número de pacientes correctamente asignados, entre el número total de individuos estudiados; así como con el área bajo la curva ROC (AUC).
- 2) Calibración: la concordancia entre los resultados estimados y los observados. Ello se evaluó con la prueba de la bondad del ajuste, que en el caso de los modelos ordinales se estudia a través de la prueba de Lipsitz con la función "lipsitz.test" del paquete "generalhoslem" (236). Una prueba de Lipsitz no significativa sugiere una buena calibración.
- 3) Parsimonia: el modelo debe lograr una buena discriminación y calibración con el menor número de variables posibles.
- 4) Practicidad: el modelo debe permitir un cálculo rápido y fácil de interpretar. Con tal motivo fue creada la aplicación web, facilitando el uso de este modelo pronóstico en la práctica clínica diaria.

4.3.4.3. ESTUDIO DEL MODELO SEGÚN LA CLASIFICACIÓN TOAST

El subtipo de ictus isquémico característico en el CADASIL es el lacunar (pequeños infartos subcorticales). Por ello, el modelo fue evaluado para cada subtipo de ictus isquémico según la clasificación TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment Subtype Classification*) y así poder cerciorarse de que es igual de preciso en el ictus isquémico de etiología lacunar.

4.3.4.4. ESTUDIO DE LAS POSIBLES DIFERENCIAS

Se evaluaron las diferencias existentes entre las cohortes de descubrimiento y de replicación. De la misma manera, se exploraron las diferencias en las variables del modelo pronóstico (edad, glicemia inicial, dislipemia, NIHSS inicial y mRS inicial) entre los pacientes con una predicción certera por parte del modelo y aquellos con una errónea. Este estudio permite identificar en qué situaciones el modelo es más eficaz.

Las pruebas empleadas para la realización de estos análisis fueron las siguientes: test del Chi-cuadrado para las variables categóricas con la función "chisq.test" del paquete "stats" (237), y la prueba U de Mann-Whitney para las variables numéricas u ordinales con la función "wilcox.test" del paquete "stats" (237).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE PACIENTES CON SOSPECHA DE CADASIL Y MUTACIONES PUNTUALES EN *NOTCH3*, SIN AFECTACIÓN DEL NÚMERO DE CISTEÍNAS

Tras la exploración en los principales metabuscadores con las palabras clave “CADASIL cysteine”, “*NOTCH3* cysteine”, y “*NOTCH3* polymorphism”, para revisar aquellos pacientes descritos en la literatura con sospecha de CADASIL y mutaciones puntuales que afectasen a *NOTCH3*, y que no dieran lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor, junto con el estudio de las mutaciones descritas en *The Human Gene Mutation Database*, se obtuvieron un total de 244 estudios.

De los 244 artículos, 225 fueron excluidos al estudiar endofenotipos distintos al CADASIL, considerar mutaciones distintas a las puntuales que no afectasen al número de cisteínas, o estudiar polimorfismos ya descritos. De las 19 publicaciones restantes, una de ellas fue excluida al no ser posible la identificación de forma precisa del caso índice. Finalmente, 18 artículos cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, describiendo un total de 34 casos índice, con 25 mutaciones diferentes. No en todos los casos fue posible conseguir la información clínico-epidemiológica de los pacientes, al estar ausente en el artículo original. Con los datos recopilados, se obtuvo la siguiente información demográfica: 12 de los 18 pacientes, con datos en relación con el género, eran mujeres (67%) y seis eran hombres (33%); 17 de 34 eran europeos (50%), 14 eran asiáticos (41%), dos de Oceanía (6%) y uno era norteamericano (3%).

5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES OBTENIDAS

En total se identificaron 25 mutaciones puntuales presentes en el gen *NOTCH3*, en los 34 casos índices descritos, de los 18 artículos revisados y, que no dan lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor. En la Tabla 3 se muestran las principales características genéticas de los 34 casos índice.

El estudio de los 33 exones de *NOTCH3* (exoma completo del gen) fue realizado en el 29% (8 de 28) de los casos donde fue especificado el tipo de secuenciación. Los sujetos a los que no se les estudiaron los 33 exones del gen, no es posible descartarles la existencia

de mutaciones concomitantes que afecten a residuos cisteína en el resto de la proteína. Las mutaciones encontradas para las que sí se analizaron los 33 exones del gen fueron: p.R61W (238), p.R75P (239), p.D80G (240), p.G149V (241), p.R213K (242), p.L1515P (243) y p.V1762M (244).

De las mutaciones puntuales reportadas en la literatura, que no dan lugar a un cambio en el número de residuos cisteína en el receptor, en el 44% afectaban al aminoácido arginina, y en el 26% a la prolina. Todas afectaban a las EGFr, a excepción de dos mutaciones que se encontraban en exones codificantes del ICD: p.L1515P (243) y p.V1762M (244).

La evaluación de la frecuencia alélica mediante su búsqueda en los portales del ExAC y *1000 Genomes Project*, para cada mutación, mostró que: p.H1235L (245), p.H170R (246,247), p.S497L (248), p.A1020P (249) y p.H1133Q (248) eran polimorfismos o variantes subpolimórficas, pues poseían una MAF >0,1%.

Tabla 3. Mutaciones puntuales encontradas en la literatura, que afectan a *NOTCH3*, y que no dan lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor.

	Mutación	Aminoác. reemplaz.	Aminoác. sustituy.	Exón	Secuenciación realizada	MAF (ExAC)	MAF (1000 Genomes)	Autor y referencia
1	p.R61W	Arg	Trp	2	Los 33 exones (exoma completo)	$7,47 \times 10^{-5}$	-	Brass (238)
2	p.R75P	Arg	Pro	3	Exones 3,4,11,18 e intrones flanqueantes	0	0	Kim (250)
3	p.R75P	Arg	Pro	3	Exones 3,4,11,18 e intrones flanqueantes	0	0	Kim (250)
4	p.R75P	Arg	Pro	3	Exones 3,4,11,18 e intrones flanqueantes	0	0	Kim (250)
5	p.R75P	Arg	Pro	3	Los 33 exones (exoma completo) y promotores	0	0	Mizuno (239)
6	p.R75P	Arg	Pro	3	Los 33 exones (exoma completo) y promotores	0	0	Mizuno (239)
7	p.R75P	Arg	Pro	3	Exones 2-24	0	0	Wang (251)
8	p.D80G	Asp	Gly	3	Los 33 exones (exoma completo)	0	0	Wollenweber (240)
9	p.R107W	Arg	Trp	3	Exones 2-23	$1,75 \times 10^{-5}$	-	Ungaro (245)
10	p.G149V	Gly	Val	4	Los 33 exones e intrones flanqueantes	0	0	Ge (241)
11	p.Q151E	Gln	Glu	4	Exones 2-23	$5,70 \times 10^{-5}$	-	Ungaro (245)
12	p.Q151E	Gln	Glu	4	Exones 2-6,8,11,14,18,19,22,23 e intrones flanqueantes	$5,70 \times 10^{-5}$	-	Ampuero (246)

13	p.H170R	His	Arg	4	Exones 2-6,8,11,14,18,19,22,23 e intrones flanqueantes	$1,91 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	Ampuero (246)
14	p.H170R	His	Arg	4	Exones 2,3,4,11,18,19	$1,91 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	Roy (247)
15	p.A198T	Ala	Thr	4	Exones 2-23	$2,51 \times 10^{-5}$	-	Ungaro (245)
16	p.A202V	Ala	Val	4	Exones 2,3,4,11,18,19	$1,67 \times 10^{-5}$	-	Roy (247)
17	p.R207H	Arg	His	4	Exones 2-23	$1,67 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-4}$	Ungaro (245)
18	p.R213K	Arg	Lys	4	-	0	0	Uchino (252)
19	p.R213K	Arg	Lys	4	Los 33 exones (exoma completo)	0	0	Santa (242)
20	p.V237M	Val	Met	5	-	$2,24 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-4}$	Uchino (252)
21	p.V252M	Val	Met	5	Exones 2-23 e intrones flanqueantes	$2,24 \times 10^{-4}$	-	Abramycheva (248)
22	p.E309K	Glu	Lys	6	Exones 2-23	0	0	Ungaro (245)
23	p.S497L	Ser	Leu	9	Exones 2-23 e intrones flanqueantes	$1,23 \times 10^{-2}$	$7,4 \times 10^{-3}$	Abramycheva (248)
24	p.T577A	Thr	Ala	11	-	$1,67 \times 10^{-5}$	0	Ferreira (112)
25	p.R592S	Arg	Ser	11	Exones 2-23	$6,71 \times 10^{-5}$	-	Ungaro (245)
26	p.V644D	Val	Asp	12	Exones 2-23	$7,01 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	Ungaro (245)
27	p.S978R	Ser	Arg	18	-	$4,61 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	Ferreira (112)
28	p.A1020P	Ala	Pro	19	-	$7,32 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-1}$	Scheid (249)
29	p.A1020P	Ala	Pro	19	-	$7,32 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-1}$	Scheid (249)
30	p.T1098S	Thr	Ser	20	Exones 2-24	0	0	Wang (251)

31	p.H1133Q	His	Gln	21	Exones 2-23 e intrones flanqueantes	$1,02 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-3}$	Abramycheva (248)
32	p.H1235L	His	Leu	22	Exones 2-23	$3,99 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	Ungaro (245)
33	p.L1515P	Leu	Pro	25	Los 33 exones (exoma completo) e intrones flanqueantes	0	0	Fouillade (243)
34	p.V1762M	Val	Met	29	Los 33 exones (exoma completo)	$2,14 \times 10^{-4}$	-	Bersano (244)

En la tabla se muestran las principales características genéticas de los 34 casos índice: mutación, aminoácido reemplazado, aminoácido sustituyente, exón donde se encuentra la mutación, la secuenciación de *NOTCH3* realizada, MAF según el *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), MAF según *1000 Genomes Project*, autor y referencia.

5.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS CASOS ÍNDICES

En la Tabla 4, se resumen las principales características clínico-epidemiológicas de los casos índice, con mutaciones puntuales que afectan a *NOTCH3*, y que no dan lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor.

De los 34 casos índice descritos en los 18 artículos, el 33% presentaban factores de riesgo cardiovascular como ser fumador, hipertenso y/o padecer dislipemia.

Los síntomas clínicos presentados por estos pacientes fueron: migraña en el 93% de los casos, ictus en el 100%, crisis epilépticas en el 60%, trastornos psiquiátricos en el 100%, parálisis pseudobulbar en el 80%, demencia en el 94% y alteración de la marcha en cuatro de ellos. Asimismo, el 96% de los pacientes presentaban historia familiar de ictus y/o demencia.

Los datos de neuroimagen revelaron que todos los casos índices tenían WMH difusa. Sin embargo, en el 91% de los casos no se encontraba afectado el polo temporal.

A nueve de los casos índices se les sometió a una biopsia de piel, visualizándose, en seis de ellos por microscopía electrónica, los depósitos de GOMs (67%). De la misma manera, en dos de los casos índices en los que no se evaluó la presencia de GOMs, el estudio realizado a sus hermanos sintomáticos, demostraron la existencia de estos depósitos patognomónicos de la enfermedad. Las mutaciones con presencia de GOM en la biopsia de piel de los casos índices o sus hermanos, fueron: p. R61W (238), p.R75P (239,250,251), p.D80G (240), p.R213K (242), p.A1020P (249) (en uno de los dos casos índices publicados) y p.T1098S.

Por otra parte, los estudios de tres de los nueve casos índices con mutaciones puntuales que afectan a *NOTCH3*, sin cambios en el número de cisteínas del receptor, no hallaron GOMS en la biopsia de piel: p.A1020P (249) (en uno de los dos casos índices publicados), p.L1515P (243) y p.V1762M (244). Las dos últimas corresponden a mutaciones que afectan al ICD.

Tabla 4: Características clínico-epidemiológicas de los casos índice con mutaciones puntuales que afectan a *NOTCH3*, y que no dan lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor.

	Mutación	Origen	S	Fum. (n=7)	HTA (n=15)	DM (n=13)	DLP (n=11)	Inicio de los sint. (años)	Migr. (n=15)	Ictus (n=17)	Crisis (n=5)	Psic. (n=8)	PP (n=5)	Dem. (n=18)	Alt. march. (n=4)	AF (n=25)	WMH PT (n=11)	GOM (n=10)	Ref.
1	p.R61W	USA	-	Sí	No	No	Sí	20	Sí	Sí	-	-	-	-	-	Sí	No	*	(238)
2	p.R75P	Corea	H	-	Sí	No	No	53	-	Sí	-	-	-	Sí	-	Sí	-	Sí	(250)
3	p.R75P	Corea	M	No	No	No	No	47	-	Sí	-	-	-	-	-	Sí	-	-	(250)
4	p.R75P	Corea	M	No	Sí	No	No	65	-	Sí	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(250)
5	p.R75P	Japón	M	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	Sí	No	-	(239)
6	p.R75P	Japón	M	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí	-	-	Sí	No	Sí	(239)
7	p.R75P	China	H	-	-	-	-	34	-	Sí	-	Sí	-	-	-	No	No	Sí	(251)
8	p.D80G	Alemania	M	No	No	No	No	-	No	Sí	-	Sí	-	Sí	Sí	Sí	Sí	*	(240)
9	p.R107W	Alemania	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
10	p.G149V	China	M	No	No	No	No	39	-	Sí	-	-	-	-	-	Sí	No	-	(241)
11	p.Q151E	Italia	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
12	p.Q151E	España	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	(246)
13	p.H170R	España	-	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	-	-	-	-	(246)
14	p.H170R	Oceania	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(247)
15	p.A198T	Italia	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
16	p.A202V	Oceania	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(247)
17	p.R207H	Italia	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
18	p.R213K	Japón	H	-	No	No	No	63	Sí	Sí	No	-	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	(252)
19	p.R213K	Japón	H	-	No	No	No	10	Sí	Sí	-	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	Sí	(242)
20	p.V237M	Japón	M	-	No	No	No	71	-	Sí	No	-	No	Sí	Sí	Sí	-	-	(252)
21	p.V252M	Rusia	-	-	No	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(248)
22	p.E309K	Italia	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
23	p.S497L	Rusia	-	-	No	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(248)
24	p.T577A	Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(112)
25	p.R592S	Italia	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
26	p.V644D	Italia	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
27	p.S978R	Portugal	M	-	-	-	-	-	-	Sí	Sí	Sí	-	Sí	-	-	-	-	(112)
28	p.A1020P	Alemania	M	-	Sí	-	-	Adolesc.	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	No	Sí	(249)
29	p.A1020P	Alemania	M	-	Sí	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	Sí	No	No	(249)
30	p.T1098S	China	H	-	-	-	-	39	-	Sí	-	Sí	-	Sí	-	Sí	No	Sí	(251)
31	p.H1133Q	Rusia	-	-	No	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(248)
32	p.H1235L	Italia	-	-	-	-	-	-	Sí	-	-	-	-	Sí	-	Sí	-	-	(245)
33	p.L1515P	Francia	M	No	No	No	No	35	Sí	Sí	-	-	-	-	-	Sí	No	No	(243)

34	p.V1762M	Italia	M	Si	-	-	Si	Infanc.	Si	-	-	Si	-	No	-	Si	No	No	(244)
%				29%	27%	0%	18%		93%	100%	60%	100%	80%	94%	100%	96%	9%	40%	

S: sexo; Fum: fumador; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; DLP: dislipemia; Inicio de los sínt.: edad de inicio de los síntomas; Migr.: migraña; Psiq: alteraciones psiquiátricas; PP: parálisis pseudobulbar; Demen: demencia; Alt march: alteración de la marcha; GOM: Granular osmiophilic material; Ref.: referencia. H: hombre; M: mujer; Adolesc.: adolescencia; Infanc.: infancia; %: porcentaje.

AF: antecedentes familiares.

WMH PT: hiperintensidades de sustancia blanca con afectación del polo temporal.

* GOM encontrados en el hermano del probando, el cual era sitomático.

5.1.3. MUTACIONES PUNTUALES QUE AFECTAN A *NOTCH3* Y QUE NO AFECTAN AL NÚMERO DE CISTEÍNAS DEL RECEPTOR, CONSIDERADAS POTENCIALMENTE PATOGENICAS

En la Tabla 5 se encuentran plasmados los criterios requeridos para considerar patogénicas y responsables de la clínica del paciente, junto con el tipo de mutación, a las mutaciones puntuales que afectan a *NOTCH3*, y que no dan lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor: presencia del cuadro clínico característico de CADASIL (migraña, alteraciones psiquiátricas, ictus y/o demencia); HS difusas; la realización del análisis de los 33 exones de *NOTCH3* y la exclusión de polimorfismos o variantes subpolimórficas.

Tabla 5. Resumen con las principales características de las mutaciones puntuales que afectan a *NOTCH3*, y que no dan lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor.

	Mutac.	Clínica caract. de CADASIL	HS	Análisis completo	Mutac.	GOM	Referencia
1	p.R61W	Sí	Sí	Sí	Sí	*	(238)
2	p.R75P	Sí	Sí	No	Sí	Sí	(250)
3	p.R75P	Sí	Sí	No	Sí	-	(250)
4	p.R75P	Sí	Sí	No	Sí	-	(250)
5	p.R75P	Sí	Sí	Sí	Sí	-	(239)
6	p.R75P	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	(239)
7	p.R75P	Sí	Sí	No	Sí	Sí	(251)
8	p.D80G	Sí	Sí	Sí	Sí	*	(240)
9	p.R107W	Sí	Sí	No	Sí	-	(245)
10	p.G149V	Sí	Sí	Sí	Sí	-	Ge
11	p.Q151E	Sí	Sí	No	Sí	-	(245)
12	p.Q151E	Sí	Sí	No	Sí	-	(246)
13	p.H170R	Sí	Sí	No	No	-	(246)
14	p.H170R	Sí	NE	No	No	-	(247)
15	p.A198T	Sí	Sí	No	Sí	-	(245)
16	p.A202V	Sí	NE	No	Sí	-	(247)
17	p.R207H	Sí	Sí	No	Sí	-	(245)

18	p.R213K	Sí	Sí	NE	Sí	-	(252)
19	p.R213K	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	(242)
20	p.V237M	Sí	Sí	NE	Sí	-	(252)
21	p.V252M	Sí	Sí	No	Sí	-	(248)
22	p.E309K	Sí	Sí	No	Sí	-	(245)
23	p.S497L	Sí	NE	No	No	-	(248)
24	p.T577A	NE	NE	NE	Sí	-	(112)
25	p.R592S	Sí	Sí	No	Sí	-	(245)
26	p.V644D	Sí	Sí	No	Sí	-	(245)
27	p.S978R	Sí	Sí	NE	Sí	-	(112)
28	p.A1020P	Sí	Sí	NE	No	Sí	(249)
29	p.A1020P	Sí	Sí	NE	No	No	(249)
30	p.T1098S	Sí	Sí	No	Sí	Sí	(251)
31	p.H1133Q	Sí	NE	No	No	-	(248)
32	p.H1235L	Sí	Sí	No	No	-	(245)
33	p.L1515P	Sí	Sí	Sí	Sí	No	(243)
34	p.V1762M	Sí	Sí	Sí	Sí	No	(244)

Mutac.: mutación; Clínica caract. de CADASIL: clínica característica de CADASIL (migraña, alteraciones psiquiátricas, ictus y/o demencia); HS: hiperintensidades subcorticales; Análisis completo: análisis completo de los 33 exones de *NOTCH3*; Mutac: si se excluía que se tratase de un polimorfismo o variante subpolimórfica. NE: no especificado.

Los requisitos anteriormente citados, para considerar una mutación sin cambios en el número de cisteínas potencialmente patogénica, se cumplen para: p.R61W (238), p.R75P (239), p.D80G (240) y p.R213K (242). Por tanto, se consideran potencialmente patogénicas y responsables de CADASIL al presentar su clínica característica, HS difusas, haber descartado otras mutaciones concomitantes al haber analizado el exoma completo de *NOTCH3*, no tratarse de polimorfismos ni variantes subpolimórficas, y presentar GOMs en la biopsia de piel de los pacientes.

Asimismo, en relación con la co-segregación de estas mutaciones potencialmente patogénicas:

- p.R75P: Mizuno *et al.* estudiaron a los familiares de los casos índice con esta mutación (239). Aquellos con la clínica característica de CADASIL e HS difusas, tenían la misma mutación y, por el contrario, los familiares asintomáticos no la presentaban.

- p.D80G: dos hermanas y un hermano con clínica característica de CADASIL y HS extensa presentaban la misma mutación, a diferencia del hermano asintomático. Cabe recalcar la realización de una biopsia de piel en el hermano sintomático, hallándose GOMs en la misma, a diferencia del hermano asintomático.
- El estudio de co-segregación no se realizó ni para p.R61W ni p.R213K.

De los diez casos índices con una de estas cuatro mutaciones se puede observar que:

- El 60% presentaban la mutación p.R75P.
- El 80% eran asiáticos.
- Respecto a los factores de riesgo cardiovascular: el 25% eran fumadores, el 29% presentaban HTA, ninguno presentaba DM y el 29% presentaban dislipemia.
- Respecto a la clínica característica del CADASIL: el 75% presentaba migraña, y el 100% de los casos donde se especificó, alteraciones psiquiátricas, ictus y demencia.
- El 90% presentaban antecedentes familiares de ictus y/o demencia.
- Sólo en uno de los casos índice (p.D80G) el polo temporal presentaba HS.
- Todos los pacientes (o sus hermanos sintomáticos) con biopsia de piel disponible presentaron GOMs.

Tabla 6: características clínico-epidemiológicas de los casos índice con mutaciones puntuales que afectan a *NOTCH3*, y que no dan lugar a un cambio en el número de cisteínas del receptor, consideradas potencialmente patogénicas en la presente tesis.

	Mutación	Origen	S	Fum. (n=4)	HTA (n=7)	DM (n=7)	DLP (n=7)	Migraña (n=4)	Ictus (n=10)	Psic (n=4)	Dem. (n=5)	AF (n=10)	HS (n=5)	PT	GOM (n=6)	Autor
1	p.R61W	USA	-	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	-	-	Sí	No	-	*	Brass
2	p.R75P	Corea	H	-	Sí	No	No	-	Sí	-	Sí	Sí	-	-	Sí	Kim
3	p.R75P	Corea	M	No	No	No	No	-	Sí	-	-	Sí	-	-	-	Kim
4	p.R75P	Corea	M	No	Sí	No	No	-	Sí	-	Sí	Sí	-	-	-	Kim
5	p.R75P	Japón	M	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí	No	-	-	Mizuno
6	p.R75P	Japón	M	-	-	-	-	-	Sí	-	-	Sí	No	-	Sí	Mizuno
7	p.R75P	China	H	-	-	-	-	-	Sí	Sí	-	No	No	-	Sí	Wang
8	p.D80G	Alem.	M	No	No	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	*	Wollenweber
9	p.R213K	Japón	H	-	No	No	No	Sí	Sí	-	Sí	Sí	-	-	-	Uchino
10	p.R213K	Japón	H	-	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	-	Sí	Santa
%				25%	29%	0%	29%	75%	100%	100%	100%	90%	20%		100%*	

S: sexo; Fum: fumador; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; DLP: dislipemia; Psic: alteraciones psiquiátricas; Demen: demencia; GOM: Granular osmiophilic material. Alem.: Alemania, H: hombre; M: mujer; %: porcentaje; AF: antecedentes familiares; HS PT: hiperintensidades subcorticales con afectación del polo temporal.

* GOM encontrados en el hermano del probando, siendo este sintomático.

5.2. ESTUDIO DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LAS BIOPSIAS DE PIEL DE PACIENTES CON CADASIL Y CONTROLES

Para la búsqueda de ARNm diferencialmente expresados en pacientes con CADASIL respecto a controles, se seleccionaron dos cohortes:

- La cohorte de descubrimiento: formada por cuatro pacientes con CADASIL pertenecientes a tres familias diferentes y, tres controles (hermanos de los pacientes) sin mutaciones en *NOTCH3*.
- La cohorte de replicación: formada por diez pacientes con CADASIL y ocho controles, no siendo en este caso necesaria la consanguinidad.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad, sexo, hábito tabáquico, HTA o dislipemia, entre casos y controles, ni en la cohorte de descubrimiento, ni en la cohorte de replicación (Tabla 7).

Tabla 7: Características clínico-epidemiológicas de la cohorte de descubrimiento y de replicación.

	Casos CD (n=4)	Controles CR (n=3)	Valor de p	Casos CR (n=10)	Controles CR (n=8)	Valor de p
Edad (media±SD, años)	52±15	58±16	0.21	49±15	42±10	0.31
Mujer	75% (3/4)	67% (3/2)	1	50% (5/10)	50% (4/8)	1
Tabaco	0%	33% (1/3)	0.43	10% (1/10)	25% (2/8)	0.56
HTA	0%	33% (1/3)	0.43	36% (3/10)	13% (1/8)	0.59
DM	0%	0%	1	10% (1/10)	0%	1
DLP	25% (1/4)	0%	1	30% (3/10)	25% (2/8)	1

Tabaco: consumo de tabaco; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; DLP: dislipemia.

Asimismo, la DM fue la única variable significativamente diferente entre los casos de la cohorte de descubrimiento y los de la cohorte de replicación ($p = 0.01$).

En la Figura 10 podemos encontrar la distribución de las mutaciones en los dos estudios de expresión diferencial.

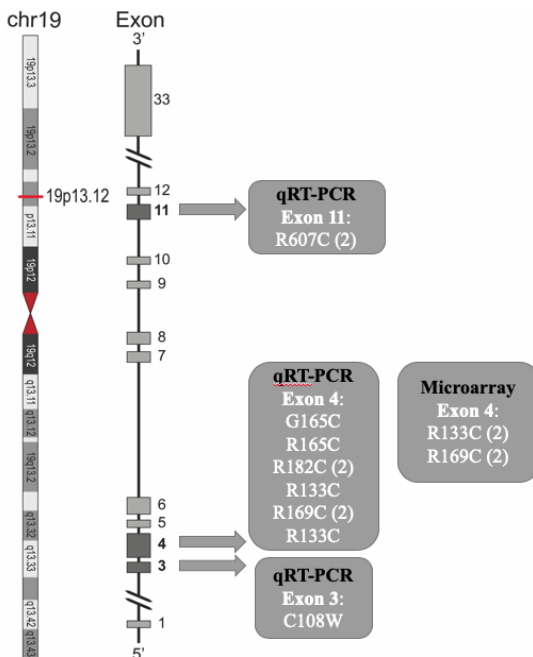


Figura 10. Distribución de las mutaciones de los pacientes con CADASIL en el estudio de expresión diferencial, con el método de microarrays y de qRT-PCR. Se muestra el cromosoma 19, cuya ubicación de *NOTCH3* se localiza en la banda 19p13.12. Las mutaciones pertenecientes a los pacientes del estudio GWTS se encuentran en el exón 3 y, las del estudio realizado con la técnica de qRT-PCR, repartidos en el exón 3, 4 y 11.

Chr19: cromosoma 19.

En la Tabla 8 se pueden observar los resultados más significativos del estudio GWTS y los valores del logaritmo de la magnitud del cambio de los pacientes con CADASIL respecto a los controles.

Tabla 8. Los quince ARNm diferencialmente expresados de forma más significativa, asociados a CADASIL en el estudio GWTS.

Símbolo	Nombre del gen	logFC	Valor de p
<i>BANP</i>	BTG3 associated nuclear protein	-1,40	7,23x10 ⁻⁴
<i>PDCD6IP</i>	Programmed cell death 6 interacting protein	-1,20	8,36x10 ⁻⁴
<i>TMEM176A</i>	Transmembrane protein 176A	-1,23	1,87x10 ⁻³
<i>C16orf70</i>	Chromosome 16 open reading frame 70	-1,10	2,37x10 ⁻³
<i>JCHAIN</i>	Joining chain of multimeric IgA and IgM	-1,46	2,87x10 ⁻³
<i>CCDC149</i>	Coiled-coil domain containing 149	-1,00	3,57x10 ⁻³
<i>GLT8D2</i>	Glycosyltransferase 8 domain containing 2	-1,76	3,95x10 ⁻³
<i>PPIE</i>	Peptidylprolyl isomerase E	0,94	3,97x10 ⁻³
<i>ZFP64</i>	ZFP64 zinc finger protein	-0,99	4,40x10 ⁻³
<i>CAMK2G</i>	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II gamma	-0,85	4,52x10 ⁻³
<i>CPA3</i>	Carboxypeptidase A3	-1,10	4,66x10 ⁻³
<i>E2F4</i>	E2F transcription factor 4	0,89	4,77x10 ⁻³
<i>ZBTB24</i>	Zinc finger and BTB domain containing 24	-0,91	4,95x10 ⁻³
<i>AP3M2</i>	Adaptor related protein complex 3 subunit mu 2	-1,26	4,96x10 ⁻³
<i>SFMBT2</i>	Scm like with four mbt domains 2	-0,98	5,37x10 ⁻³

logFC: logaritmo de la magnitud del cambio.

Tras la aplicación de la corrección por múltiples comparaciones con el método de Benjamini y Hochberg, no se hallaron ARNm con diferencias estadísticamente significativas.

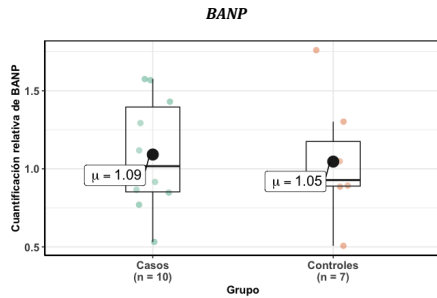
Se realizó un segundo estudio mediante qRT-PCR con el objetivo de replicar los resultados obtenidos en el estudio GWTS. Se analizaron:

- Los dos ARNm estadísticamente más significativos en el GWTS, con un valor de $p < 1,0 \times 10^{-3}$:

- *BANP*, con un valor de $p = 7,23 \times 10^{-4}$, infraexpresado en casos.
- *PDCD6IP*, con un valor de $p = 8,36 \times 10^{-4}$, infraexpresado en casos.
- Dos ARNm, de entre los 15 diferencialmente expresados de forma más significativa, que tuviesen relación con la isquemia neuronal:
 - *CAMK2G*, con un valor de $p = 4,52 \times 10^{-3}$, infraexpresado en casos.
 - *E2F4*, con un valor de $p = 4,77 \times 10^{-3}$, sobreexpresado en casos.

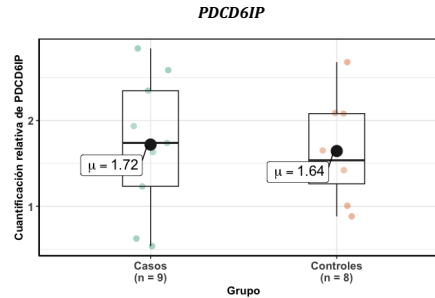
La aplicación de los controles de calidad mencionados en la sección “3.2.5. Estudio de la expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR” se tradujo en la pérdida de una de las muestras del grupo control para el ARNm correspondiente al gen *BANP* y de una de las muestras del grupo de casos para el ARNm correspondiente al gen *PDCD6IP*. Posteriormente, se realizó el análisis de la detección de los *outliers* mediante la representación gráfica de la RQ de cada participante por molécula analizada, y la prueba Q de Dixon (Figura 11). Ello se tradujo en la pérdida de una muestra del grupo control para el ARNm correspondiente al gen *E2F4*.

1A



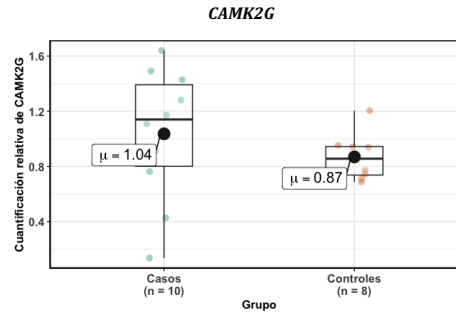
p valor de la prueba Q de Dixon para casos: 0,74
p valor de la prueba Q de Dixon para controles: 0,34

1B



p valor de la prueba Q de Dixon para casos: 0,26
p valor de la prueba Q de Dixon para controles: 0,48

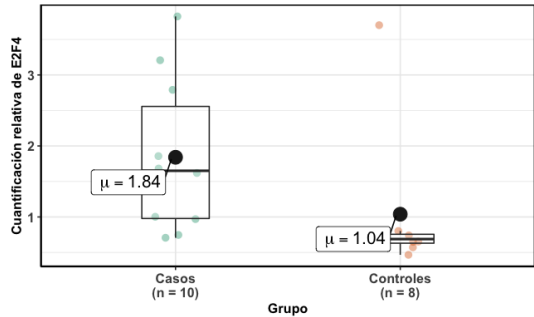
1C



p valor de la prueba Q de Dixon para casos: 0,81
p valor de la prueba Q de Dixon para controles: 0,15

1D

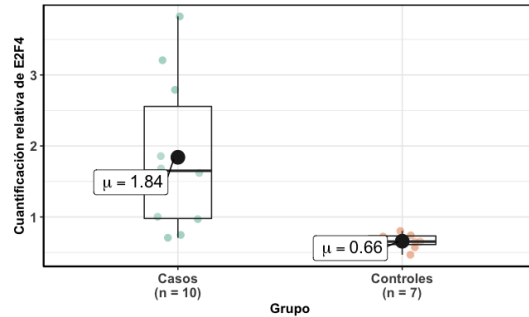
E2F4



p valor de la prueba Q de Dixon para casos: 0,87
p valor de la prueba Q de Dixon para controles: $2,2 \times 10^{-6}$

1E

E2F4



p valor de la prueba Q de Dixon para casos: 0,87
p valor de la prueba Q de Dixon para controles: 0,49

Figura 11. Diagrama de cajas de la RQ obtenida en el estudio de expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR, por cada ARNm analizado, según el grupo caso o control. Representación gráfica que muestra los *outliers* y su significancia mediante la prueba Q de Dixon. Se muestra el número total de muestras analizadas para cada ARNm. Figura 1A para el estudio de *outliers* de *BANP*, figura 1B para *PDCD6IP*, figura 1C para *CAMK2G*, 1D para *E2F4*, y 1E para *E2F4* sin *outliers*.

En la Tabla 9 se puede observar el resumen del estudio de expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR.

Tabla 9. Media, desviación estándar (SD) y valor de p obtenidos para los ARNm del estudio de expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR. En la tabla se hace constar el número total de pacientes válidos para el análisis tras los controles de calidad de la qRT-PCR y la eliminación de las muestras consideradas *outliers*.

	RQ de los casos (media±SD)	RQ de los controles (media±SD)	Valor de p
BANP (10 casos, 7 controles)	1.09±0.36	1.05±0.39	1
PDCD61P (9 casos, 8 controles)	1.72±0.81	1.64±0.61	0.884
CAMK2G (10 casos, 8 controles)	1.03±0.48	0.87±0.17	0.12
E2F4 (10 casos, 7 controles)	1.84±1.09	0.66±0.11	1.23x10⁻³

RQ: cuantificación relativa; SD: desviación estándar.

De los cuatro ARNm estudiados, *E2F4* fue el único que se asoció de forma estadísticamente significativa en pacientes con CADASIL. Sus niveles se encontraban sobreexpresados en los casos, comparado con los controles. La cuantificación relativa en los pacientes con CADASIL fue de $1,84 \pm 1,09$ (media \pm SD), y $0,66 \pm 0,11$ (media \pm SD) en los controles, con un valor de $p = 1,23 \times 10^{-3}$.

Tras la corrección por comparaciones múltiples con el método de Bonferroni, los resultados continuaban siendo estadísticamente significativos, con un valor de p ajustado = $4,92 \times 10^{-3}$.

A cinco de los pacientes con CADASIL del estudio de replicación, mediante qRT-PCR, se les realizó un estudio neuropsicológico completo. Todos los dominios cognitivos se encontraban alterados en $>50\%$ de los pacientes (z-score negativo), excepto en el caso de la función visuoespacial (Tabla 10 y Figura 12).

Tabla 10. Z-score de las pruebas neuropsicológicas correspondientes a los cinco pacientes con CADASIL del estudio de expresión diferencial mediante qRT-PCR, por cada dominio cognitivo, ajustado por edad y nivel educacional.

	% de Z-score negativo
Función ejecutiva	80% (4/5)
Atención y velocidad de procesamiento de la información	60% (3/5)
Destreza	60% (3/5)
Habilidades visuoestructurativas	20% (1/5)
Memoria verbal	60% (3/5)
Memoria de trabajo	60% (3/5)

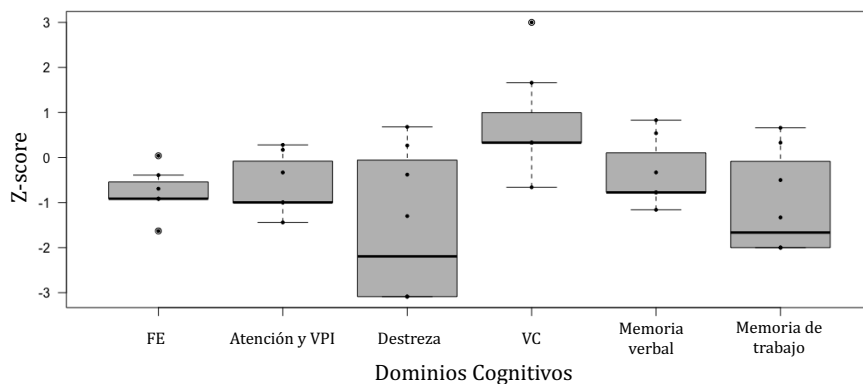


Figura 12. Z-score según los seis dominios neuropsicológicos evaluados, ajustados por edad y nivel educacional.

FE: función ejecutiva; VPI: velocidad de procesamiento de la información; VC: habilidad visuoestructurativa, memoria verbal y memoria de trabajo.

En el estudio neuropsicológico se pudo observar:

- Correlación lineal significativa entre los niveles de *E2F4* y la función ejecutiva, con un coeficiente de correlación de Pearson de -0,93 ($p = 0,02$).
- Tendencia en la correlación lineal entre los niveles de *E2F4* y la atención y VPI. El coeficiente de correlación de Pearson fue de -0,82 ($p = 8,73 \times 10^{-2}$).
- No se observó ninguna correlación lineal con el resto de los dominios cognitivos evaluados (destreza, habilidad visuoconstructiva, memoria verbal y memoria de trabajo).

La distribución de *E2F4* en los pacientes con CADASIL se consideró normal, ante una prueba de Shapiro-Wilk no significativa, y la evaluación de los modelos de los niveles de *E2F4* y su correlación lineal con la función ejecutiva y la atención y VPI, homocedástica, ante la prueba de Breusch-Pagan no significativa.

Por último, la búsqueda de *E2F4* en el portal GTEx (<https://www.gtexportal.org/home/>) puso de manifiesto su expresión en el cerebro (Figura 13). El resultado de la búsqueda en el SNBREB (<http://ngi.pub/snucRNA-seq>) demostró que, dentro del cerebro, se expresa en diferentes tipos celulares, como por ejemplo en las células endoteliales cerebrales (Figura 14).

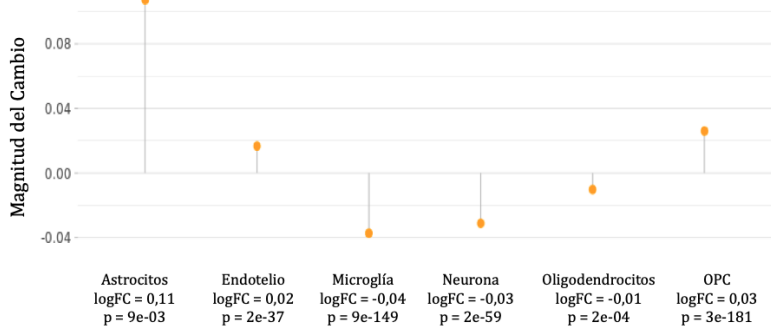


Figura 14. Perfil de expresión cerebral de *E2F4* en el portal Single-Nuclei Brain RNA-seq. LogFC: logaritmo de la magnitud del cambio; OPC: oligodendrocyte precursor cells.

5.3. CREACIÓN DE UN MODELO PRONÓSTICO PARA ESTIMAR LA DISCAPACIDAD AL TERCER MES DE HABER PADECIDO UN ICTUS ISQUÉMICO Y SU EFICACIA EN PACIENTES CON CADASIL

La obtención del *Parsifal Score* como modelo predictivo del estado funcional al tercer mes, de un individuo con un ictus isquémico, para posteriormente aplicarlo a pacientes con CADASIL que sufran un evento vascular, se obtuvo a partir de una cohorte de descubrimiento, siendo validada en una cohorte de replicación y evaluando su eficacia en una cohorte de pacientes con CADASIL.

5.3.1. CREACIÓN DEL MODELO

Para la cohorte de descubrimiento, se registraron un total de 1.142 pacientes con un ictus isquémico, no sometidos a tratamiento recanalizador, que acudieron a urgencias del Hospital del Mar (Barcelona) dentro de las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas. De ellos:

- 196 fueron excluidos al tener un mRS >2 , es decir, ya eran dependientes previamente al ictus.
- 70 fueron excluidos por tener un AIT y, por tanto, su mRS al tercer mes no se habría visto modificado como consecuencia de ese evento vascular.
- 32 pacientes fueron excluidos debido a la falta de información sobre el mRS al tercer mes.

Finalmente, se evaluaron un total de 844 pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión (cohorte de descubrimiento). El resumen de las variables clínico-epidemiológicas y el mRS al tercer mes se muestra en las tablas 11 y 12, respectivamente.

Tabla 11. Variables clínico-epidemiológicas y su comparativa entre la cohorte de descubrimiento y de replicación.

	Cohorte de descubrim.	Cohorte de replicación	Valor de p
Edad (años) (media±SD)	73±12	71±13	1.18 x 10 ⁻¹
Mujer (%)	46	44	5.81 x 10 ⁻¹
HTA (%)	71	71	9.71 x 10 ⁻¹
DM (%)	32	26	1.37 x 10 ⁻¹
DLP (%)	40	51	3.98 x 10⁻³
FA (%)	29	22	1.93 x 10⁻²
Glicemia (mg/dL)	143±67	140±57	4.28 x 10 ⁻¹
NIHSS inicial (mediana, rango intercuartílico)	4 (2-9)	7 (3-14)	1.03 x 10⁻⁹
mRS inicial (mediana, rango intercuartílico)	0 (0-0)	1 (0-1)	< 2.2 x 10⁻¹⁶
mRS al tercer mes (mediana, rango intercuartílico)	2 (1-3)	2 (1-4)	2.44 x 10⁻³

Cohorte de descubrim.: cohorte de descubrimiento; HTA: hipertensión arterial; DM: Diabetes Mellitus; DLP: dislipemia; FA: fibrilación auricular; mRS: modified Rankin Scale.

Tabla 12. Distribución de la variable de mRS al tercer mes en los pacientes de la cohorte de descubrimiento.

mRS al tercer mes	
0	20% (170/844)
1	21% (178/844)
2	22% (184/844)
3	13% (110/844)
4	9% (76/844)
5	2% (19/844)
6	13% (107/844)

La regresión logística ordinal univariada muestra que, las variables asociadas de forma estadísticamente significativa al mRS al tercer mes, son: la edad, el sexo, la HTA, la dislipemia, la FA, la toma de tratamiento anticoagulante, la concentración de dímero D,

la concentración de PCR, la concentración de glicemia inicial, el valor del NIHSS inicial y el mRS inicial (tabla 13).

Tabla 13. Regresión logística ordinal univariada para el estudio de las variables asociadas de forma significativa al mRS al tercer mes.

	Coefficientes de la regresión	SE	Valor de p
NIHSS inicial	0.21731	1.28×10^{-2}	2.72×10^{-64}
mRS inicial	0.91641	8.98×10^{-2}	1.96×10^{-24}
Edad	0.04740	5.06×10^{-3}	7.45×10^{-21}
FA	1.06240	1.40×10^{-1}	2.67×10^{-14}
Sexo	-0.73355	1.24×10^{-1}	3.32×10^{-9}
Dímero D	0.00213	3.68×10^{-4}	7.59×10^{-9}
PCR	0.15789	3.46×10^{-2}	5.02×10^{-6}
Glicemia inicial	0.00424	9.479×10^{-4}	7.65×10^{-6}
HTA	0.47707	1.35×10^{-1}	4.08×10^{-4}
ACO	0.31629	1.31×10^{-1}	1.59×10^{-2}
DLP	-0.21948	1.25×10^{-1}	7.86×10^{-2}
DM	0.13103	1.31×10^{-1}	3.15×10^{-1}
AT	0.16132	1.94×10^{-1}	4.06×10^{-1}

SE: error estándar; mRS: modified Rankin Scale; FA: fibrilación auricular, PCR: proteína C reactiva; HTA: hipertensión arterial, ACO: anticoagulantes orales; DLP: dislipemia, DM: Diabetes Mellitus, AT: tratamiento antiagregante.

Al realizar la regresión logística ordinal multivariable (RLOM), cinco variables continuaron asociándose de forma estadísticamente significativa al valor del mRS al tercer mes, las cuales fueron: la edad, el valor de mRS inicial, el valor de NIHSS inicial, la concentración de glicemia inicial y la presencia de dislipemia (Tabla 14). Por tanto, estas cinco variables fueron las que finalmente constituyeron el modelo pronóstico, encontrándose todas asociadas con una peor evolución, a excepción de la dislipemia. La información para ellas se encontraba disponible en 809 pacientes de los 844 iniciales.

La función “polr” utilizada en R, generó seis puntos de corte para cada nivel de la variable dependiente. Por tanto, estos seis puntos de corte establecen los siete grupos del mRS al tercer mes. Una puntuación $<2,72473$ se corresponde con un mRS estimado de 0; entre 2,72473 y 4,06643, un mRS estimado de 1; entre 4,0664 y 5,41362, un mRS estimado de 2; entre 5,41362 y 6,46096, un mRS estimado de 3; entre 6,46096 y 7,45309, un mRS estimado de 4; entre 7,45309 y 7,74067, un mRS estimado de 5; y $>7,74067$, un mRS

estimado de 6. Este número de cifras decimales es necesario para la correcta estimación del mRS por parte del modelo (Tabla 1).

Tabla 14: Regresión logística ordinal multivariable.

	Coeficientes de la SE		Valor de p
	regresión		
Edad	0,034258842	$5,44 \times 10^{-3}$	$3,07 \times 10^{-10}$
mRS inicial	0,842033047	$9,77 \times 10^{-2}$	$6,56 \times 10^{-18}$
NIHSS inicial	0,212465273	$1,34 \times 10^{-2}$	$6,18 \times 10^{-57}$
Glicemia inicial	0,004820021	$1,10 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-5}$
Dislipemia	-0,311726847	$1,33 \times 10^{-1}$	$1,88 \times 10^{-2}$
0 1	2,724725283	$4,33 \times 10^{-1}$	$3,02 \times 10^{-10}$
1 2	4,066432983	$4,42 \times 10^{-1}$	$3,68 \times 10^{-20}$
2 3	5,413615193	$4,58 \times 10^{-1}$	$3,28 \times 10^{-32}$
3 4	6,460961279	$4,74 \times 10^{-1}$	$2,98 \times 10^{-42}$
4 5	7,453092803	$4,91 \times 10^{-1}$	$6,02 \times 10^{-52}$
5 6	7,740674477	$4,97 \times 10^{-1}$	$9,71 \times 10^{-55}$

La prueba de Brant demostró que se cumplía el supuesto que establece que, el riesgo de cada par de niveles de la variable dependiente debe de ser proporcionado, y por tanto la aproximación a través de una regresión logística ordinal era adecuada.

4.3.2. COHORTE DE REPLICACIÓN

Un total de 378 pacientes fueron incluidos en la cohorte de replicación. Las principales variables clínico-epidemiológicas y la distribución del mRS de los pacientes al tercer mes en la presente cohorte, se encuentran representadas en la Tabla 15 y la Tabla 16.

Tabla 15. Distribución de la variable mRS al tercer mes en los pacientes de la cohorte de replicación.

mRS al tercer mes	
0	14% (54/378)
1	23% (86/378)
2	17% (65/378)
3	12% (45/378)
4	15% (57/378)
5	2% (8/378)
6	17% (63/378)

Las diferencias encontradas de forma estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la cohorte de descubrimiento y la cohorte de replicación, fueron la presencia de dislipemia, FA y el valor del NIHSS inicial.

4.3.3. EVALUACIÓN DEL MODELO

La evaluación del modelo se ha realizado siguiendo los criterios de idoneidad recomendados por Sim *et al.*:

- Discriminación. La precisión del *Parsifal Score* para discriminar entre pacientes dependientes o independientes al tercer mes, estableciendo el punto de corte en 5,41362, fue del 80% (644/809) en la cohorte de descubrimiento y del 76% (289/378) en la cohorte de replicación. El AUC fue de 0,86 (intervalo de confianza -IC- del 95%: 0,83-0,89) en la cohorte de descubrimiento y de 0,86 (IC del 95%: 0,82-0,90) en la cohorte de replicación (Figura 15).

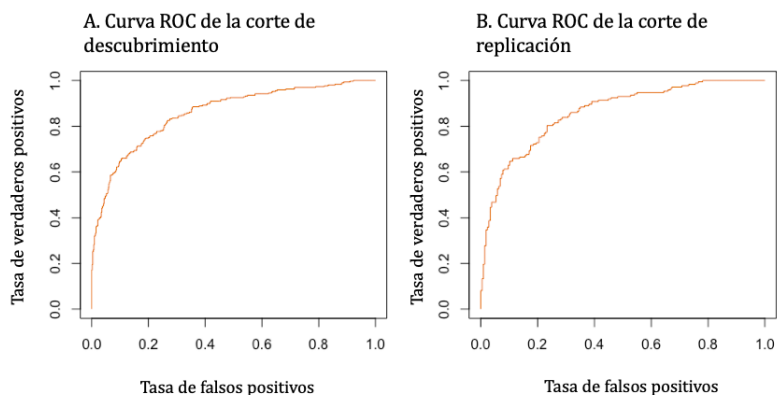
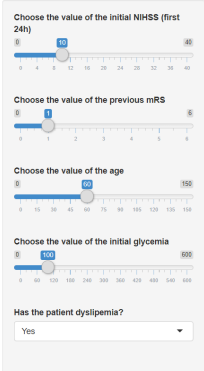


Figura 5. Curva ROC del *Parsifal Score* para la predicción de discapacidad al tercer mes. A. Curva ROC de la cohorte de descubrimiento (Hospital del Mar), con un AUC de 0,86. B: Curva ROC de la cohorte de replicación (Hospital de la Vall d'Hebron) con un AUC de 0,86.

- Calibración. Para estudiar el grado de correspondencia entre los resultados estimados y los observados, se utilizó la prueba de Lipsitz, no siendo significativa (valor de $p = 6.12 \times 10^{-1}$) y, por tanto, indicando que estamos ante un modelo bien calibrado.

- Parsimonia. Solamente con cinco variables, el modelo consigue una buena discriminación y calibración para estimar la discapacidad al tercer mes.
- Practicabilidad. Para permitir un cálculo rápido y fácil de interpretar, en la siguiente página web <https://cadasil.shinyapps.io/parsifal/> es posible calcular la discapacidad de un paciente al tercer mes de manera sencilla y rápida (Figura 16).

Parsifal score



Choose the value of the initial NIHSS (first 24h)

Choose the value of the previous mRS

Choose the value of the age

Choose the value of the initial glycemia

Has the patient dyslipemia?

Yes

It is estimated that this patient at 3rd month will be:
INDEPENDENT

The Parsifal score assigns this patient to the group:
2

This results have been obtained from a Multivariate Ordinal Logistic Regression of those independent patients with an ischemic stroke not receiving recanalization treatment within the first 24 hours. For the rest of patients, this score has not been checked. The AUC of the discovery and replication cohort was 0.86. The specificity was 90% in the discovery and 80% in the replication cohort; the sensibility was 64% in the discovery and 74% in the replication cohort.

Figura 16. Aplicativo web para el uso del *Parsifal Score*.

La especificidad para determinar la discapacidad estableciendo como punto de corte 5,41362 (límite en el que el modelo diferencia entre un mRS de 2 ó 3) es del 90% (IC del 95%: 88-93%) en la cohorte de descubrimiento y, del 80% (IC del 95%: 74-85%) en la cohorte de replicación. La sensibilidad del modelo fue del 64% (IC del 95%: 58-69%) en la cohorte de descubrimiento y, del 74% (IC del 95%: 68-81%) en la cohorte de replicación.

Por tanto, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el punto de corte establecido por el *Parsifal Score* y la discapacidad del paciente al tercer mes, tanto en la cohorte de descubrimiento ($p = 9,27 \times 10^{-65}$) como en la cohorte de replicación ($p = 9,05 \times 10^{-28}$). Además, el 93,2% de los pacientes asignados al mRS 0 realmente eran independientes, y el 90% de los asignados al grupo 6, dependientes (Tabla 16 y Figura 17).

Tabla 16. Porcentaje de pacientes independientes o dependientes según el mRS al tercer mes, estimado por el *Parsifal Score*.

Estimación del mRS al tercer mes	Indep. (CD)	Depend. (CD)	Indep. (CR)	Depend. (CD)
0	178 (93.2%)	13 (6.8%)	52 (94.5%)	3 (5.5%)
1	140 (87%)	21 (13%)	33 (84.6%)	6 (15.4%)
2	161 (62.2%)	98 (37.8%)	89 (64.5%)	49 (35.5%)
3	20 (29.4%)	48 (70.6%)	18 (45%)	22 (55%)
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	13 (10%)	117 (90%)	13 (12.3%)	93 (87.7%)

Indep.: independiente; CD: cohorte de descubrimiento; Depend.: dependiente; CR: cohorte de replicación.

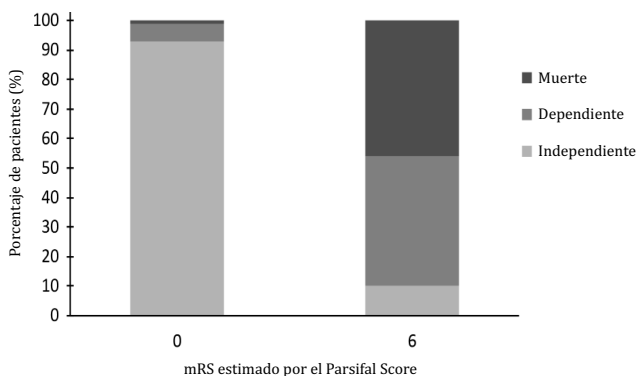


Figura 17. Proporción de pacientes independientes o dependientes según la estimación de mRS 0 y mRS 6 del *Parsifal Score*, en la cohorte de descubrimiento. El gris claro representa pacientes independientes, el gris representa pacientes dependientes y el gris oscuro, pacientes que fallecieron (considerados como dependientes en el modelo).

Por otra parte, la estimación de un mRS de 6 y, por tanto, mortalidad, se obtiene con una puntuación en el *Parsifal Score* $>7,74067$. Con este punto de corte, la predicción de mortalidad presentó un AUC de 0,88 (IC del 95%: 0,85-0,91) en la cohorte de descubrimiento y 0,82 (IC del 95%: 0,77-0,88) en la cohorte de replicación. La especificidad fue del 97% (IC del 95%: 96-98%) en la cohorte de descubrimiento y del 93% (IC del 95%: 90-96%) en la cohorte de replicación. La sensibilidad fue del 38% (IC 95%: 29-47%) en la cohorte de descubrimiento y 46% (IC del 95%: 33-57%) en la cohorte

de replicación.

Asimismo, se realizó la comparación entre el *Parsifal Score* y el *Dutch Stroke Score* (DSS), al ser este un modelo con la misma finalidad y estimado con una aproximación ordinal. Con tal fin, se calculó el DSS en la cohorte de replicación del presente trabajo, obteniendo un AUC de 0,79. Para evaluar las diferencias en la discriminación de cada modelo, se compararon las curvas ROC obtenidas en la cohorte de replicación, con la función “roc.test”, del paquete “pROC”, en R. El *Parsifal Score* discriminaba significativamente mejor (valor de $p = 1,03 \times 10^{-5}$).

Debido a que los pequeños infartos subcorticales (correspondientes a una etiología lacunar en la clasificación TOAST), son los que principalmente presentan los pacientes con CADASIL, se analizó el *Parsifal Score* por subtipo de ictus isquémico (Tabla 17). Se observó que el *Parsifal Score* podía predecir discapacidad al tercer mes en pacientes con una etiología por oclusión de gran vaso y también de pequeño vaso. Cabe destacar que, los valores de sensibilidad fueron mayores en el subtipo cardioembólico.

Tabla 17. Resultados del *Parsifal Score* en la predicción de discapacidad al tercer mes por subtipo de ictus isquémico.

	LAA	CAE	SAO	Infrec.	Indet.
Proporc.	13% (102/809)	23% (188/809)	27% (219/809)	1% (7/809)	31% (247/809)
Precisión	79% (81/102)	78% (147/188)	84% (183/219)	86% (6/7)	79% (196/247)
AUC	0.81	0.85	0.80	1	0.89
IC AUC	0.71-0.90	0.80-0.91	0.71-0.89	1-1	0.84-0.93
p valor del AUC	9.89×10^{-8}	3.55×10^{-17}	1.07×10^{-8}	0.03	8.03×10^{-25}
Sens.	58%	80%	37%	100%	64%
IC sens.	42-74%	72-87%	23-54%	100-100%	55-73%
Espec.	88%	79%	95%	67%	93%
IC espec.	80- 95%	69-87%	91-98%	0-100%	89-97%

IC: intervalo de confianza; Sens: sensibilidad; Espec: especificidad.

LAA: etiología aterosclerótica; CAE: etiología cardioembólica; SAO: oclusión de pequeño vaso (lacunar); Infrec: etiología infrecuente; Indet: etiología indeterminada.

5.3.4. ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS PACIENTES CON UNA DISCAPACIDAD CORRECTAMENTE ESTIMADA POR EL MODELO Y LOS ERRÓNEOS

Al estudiar las diferencias entre los pacientes correctamente estimados por el *Parsifal Score* y los erróneos, se observó que el score era más preciso en pacientes más jóvenes (media de edad de 72 años vs 77, $p = 6,05 \times 10^{-8}$), con NIHSS inicial más bajo (mediana de 4 vs 5, $p = 0,01$) y un mejor mRS inicial (ambos con una mediana de 0, $p = 0,02$).

5.3.5. COMPARATIVA DE LOS PRINCIPALES MODELOS PREDICTIVOS DE DISCAPACIDAD

En la Tabla 18, se comparan los principales modelos que predicen discapacidad: el iScore, ASTRAL Score, PLAN y el DSS, junto con el *Parsifal Score*.

Tabla 18: Comparación de los principales modelos pronósticos. Comparativa entre los cuatro principales modelos para predecir discapacidad tras un ictus (iScore, ASTRAL, PLAN, y DSS) y el *Parsifal Score*.

	PARSIFAL	iScore	ASTRAL	PLAN	DSS
Objetivo	<ul style="list-style-type: none"> . Discapacidad: mRS<3/>2 . Pronóstico excelente: mRS<2 . Pronóstico desfavorable: mRS>4 . Muerte: mRS = 6 	<ul style="list-style-type: none"> . Probabilidad de discapacidad (mRS>2) . Probabilidad de muerte o institucionalización 	<ul style="list-style-type: none"> . Probabilidad de discapacidad (mRS >2) 	<ul style="list-style-type: none"> . Pronóstico excelente: mRS 0-2 . Pronóstico desfavorable: mRS >4 . Mortalidad 	<ul style="list-style-type: none"> Probabilidad de presentar un mRS >2
Tiempo para la estimación	A los 3 meses	Al mes	A los 3 meses	Al mes	Al alta A los 3 meses
Tamaño muestral de la DC	809	3818	1645	4943	1227
Tamaño muestral de la RC	378	4635	1659 653	4904	1589 2107
Variables	Edad NIHSS inicial mRS inicial Glicemia inicial Historia de dislipemia	Edad Sexo Severidad del ictus Subtipo de ictus Hábito tabáquico Dependencia previa FA	Edad Severidad del ictus según la NIHSS Tiempo entre el inicio de los síntomas y la llegada al hospital Rango de afectación del campo visual Glicemia inicial	Edad Dependencia previa Cáncer Insuficiencia cardíaca FA Nivel de conciencia Déficit neurológico	Edad por década superior a 60 años NIHSS DM Ictus previo FA

		Insuficiencia cardiaca IAM previo Cáncer Diálisis Hiperglicemia inicial	Nivel de conciencia		
Discriminación (AUC)	Discapacidad: - Descubrimiento: 0,86 - Replicación: 0,86 Mortalidad: - Descubrimiento: 0,88 - Replicación: 0,82	Probabilidad de discapacidad (mRS >2): - Descubrimiento: 0,79 - Replicación: 0,68 Probabilidad de muerte o institucionalización: - Descubrimiento: 0,83 - Replicación: 0,74	Descubrimiento: 0,85 Replicación: 0,94 y 0,77	Pronóstico favorable: - Descubrimiento: 0,77 - Replicación: 0,80 Pronóstico desfavorable: - Descubrimiento: 0,89 - Replicación: 0,88. Mortalidad: - Descubrimiento: 0,85 - Replicación: 0,87	AUC (ordinal): - Descubrimiento: 0,75 - Replicación: 0,74 y 0,69
Calibración	Prueba de Lipsitz no significativa	Prueba de Hosmer-Lemeshow significativa	Prueba de Hosmer-Lemeshow no significativa	Prueba de Hosmer-Lemeshow no significativa	

DC: cohorte de descubrimiento; RC: cohorte de replicación; FA: fibrilación auricular; IAM: infarto agudo de miocardio.

5.3.6. ESTIMACIÓN DE LA DISCAPACIDAD AL TERCER EN MES EN PACIENTES CON CADASIL Y CON UN ICTUS ISQUÉMICO

Para comprobar si el *Parsifal Score* predecía de forma certera la discapacidad al tercer mes, de un paciente con CADASIL y con un ictus isquémico, se recabó la información de las cinco variables que componen el modelo (edad, valor de mRS inicial, valor de NIHSS inicial, concentración de glicemia inicial y presencia de dislipemia), de cinco pacientes con la enfermedad, que habían presentado un ictus isquémico, cuatro de ellos pertenecientes al H. del Mar, uno de ellos perteneciente al H. de la Vall d'Hebron, Barcelona. En la Tabla 19 se representan las variables del *Parsifal Score* para cada paciente, la estimación del mRS y en función de este, su discapacidad (dependencia o independencia) a los tres meses.

Tabla 19. Variables del Parsifal Score en la cohorte de CADASIL.

Edad	mRS inicial	NIHSS inicial	Glicemia inicial	DLP	mRS al tercer mes	Estimación del mRS	Estimación de discapacidad
53	1	3	93	0	1	1	Independiente
47	0	1	98	0	1	0	Independiente
66	3	5	85	0	4	3	Dependiente
73	0	3	101	1	2	1	Independiente
54	0	1	265	1	3	1	Independiente

El modelo predecía la discapacidad al tercer mes de forma certera en el 80% (5/4) de los casos. El paciente no estimado de forma correcta había presentado un síndrome de emergencia capsular.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE PACIENTES CON SOSPECHA DE CADASIL Y MUTACIONES PUNTUALES EN *NOTCH3*, SIN AFECTACIÓN DEL NÚMERO DE CISTEÍNAS

La revisión sistemática realizada en la presente tesis tenía como finalidad investigar los casos clínicos y estudios realizados en pacientes con sospecha de CADASIL y mutaciones puntuales que afectasen a *NOTCH3*, y que no dieran lugar a un cambio en el número de cisteínas en el receptor. El objetivo era describir las características de estos pacientes, y determinar si estas mutaciones podrían considerarse patogénicas.

En esta revisión se excluyeron las mutaciones sin sentido, intrónicas e inserciones o deleciones, ya que podrían modificar el número de cisteínas del receptor, como en el caso descrito por Rutten *et al.* (211).

18 artículos cumplían los criterios de inclusión para su consideración, describiendo un total de 34 pacientes con sospecha de CADASIL y 25 mutaciones puntuales distintas en *NOTCH3*, que no afectaban el número de cisteínas del receptor. La mayoría de las mutaciones se encontraban en los exones que codificaban para el ECD de Notch3, a excepción de dos de ellas, que afectaban a los exones codificantes para el ICD. Los pacientes descritos presentaban el síndrome clínico característico de CADASIL con migraña, alteraciones psiquiátricas, ictus a edad temprana y/o demencia, junto con HS difusas en la RMN.

De este trabajo se extrae que, las siguientes mutaciones pueden considerarse potencialmente patogénicas y por tanto, ser causantes de CADASIL: p.R61W (238), p.R75P (239), p.D80G (240) y p.R213K (242). Cabe destacar que todas ellas están localizadas en exones que codifican para los EGFr; localización donde, hasta el momento, se considera que las mutaciones patogénicas de la enfermedad tienen lugar. Los motivos para creer en esta causalidad son los siguientes:

- Los pacientes presentaban la clínica y neuroimagen características de los individuos con CADASIL.
- No se encontraron mutaciones adicionales en los 33 exones del gen, y que

podieran dar una mejor explicación del cuadro clínico del paciente.

- La MAF de estas mutaciones indicaba que no se trataban de polimorfismos o variantes subpolimórficas.
- Se observó la presencia de GOMs en la biopsia de piel, los cuales se consideran patognomónicos del CADASIL.

Asimismo, se observó co-segregación familiar para p.R61W (238), p.D80G (240) y p.R75P (239). Para p.R213K no se pudo determinar, debido a que los familiares no fueron evaluados.

Cabe destacar que sólo uno de los diez casos índices (el paciente portador de la mutación p.D80G (240)) presentaban afectado el polo del lóbulo temporal. Como se describió en la sección “2.6.1. Marcadores de la RMN para el diagnóstico de CADASIL”, las mutaciones que afectan al número de cisteínas del receptor, característicamente tienen WMH en el polo del lóbulo temporal, representando una sensibilidad del 89-95% y una especificidad del 80-86% para el diagnóstico de CADASIL en pacientes caucásicos (159); sin embargo, la prevalencia de las lesiones en esta localización en pacientes asiáticos es menor, del 45-71% (253). Considerando que el 80% de los pacientes de la revisión sistemática aquí realizada, eran asiáticos, cabría esperar que al menos 4-5 pacientes presentasen esta alteración, lo cual no fue así. Para poder demostrar que las mutaciones que no afectan al número de cisteínas presentan una mayor preservación del polo temporal, sería necesaria la realización de estudios dirigidos para comparar este hallazgo con pacientes con mutaciones que sí afectan al número de cisteínas, teniendo en cuenta la edad, sexo, procedencia del paciente y región de la proteína que modifica la mutación.

En 2014, Rutten *et al.* revisaron en la literatura todos los tipos de mutaciones encontradas en *NOTCH3*, para así poder proporcionar información sobre la interpretación de las mismas (211). Con respecto a las mutaciones puntuales de *NOTCH3*, que no afectaban al número de cisteínas del receptor, encontraron diez artículos con 11 mutaciones diferentes: p.R61W, p.R75P, p.Q151E, p.H170R, p.A202V, p.R213K, p.V237M, p.T577A, p.S978R, p.A1020P y p.Y1098S. Llegaron a la conclusión de que estas mutaciones no estaban asociadas con el CADASIL, a pesar de que p.R75P cumplía todos los requisitos que ellos habían propuesto para considerarlas patogénicas: 1) una evaluación completa

del gen *NOTCH3*; 2) descartar que se tratara de un polimorfismo; 3) demostrar co-segregación familiar; y 4) confirmar el diagnóstico clínico mediante la observación de depósitos de GOMs en la biopsia de piel de los pacientes portadores de la mutación.

La revisión sistemática realizada en esta tesis actualiza el trabajo de Rutten *et al.* Se han tenido en cuenta tres de los cuatro criterios que aplicaron estos autores para considerar a esta clase de mutaciones como patogénicas. Se excluyó el criterio de co-segregación familiar debido a las limitaciones, en muchas ocasiones, de analizar al árbol genealógico de los pacientes, y porque se ha demostrado que el CADASIL puede producirse por mutaciones *de novo* (1). Se ha añadido nueva información y conclusiones derivadas de la publicación de nuevos artículos. De las 11 mutaciones puntuales en *NOTCH3*, que no afectaban el número de cisteínas del receptor, encontradas previamente por Rutten *et al.*, se han actualizado a 25. De las cuatro mutaciones consideradas potencialmente patogénicas en la revisión sistemática de esta tesis:

- La mutación p.R75P reportada por Mizuno *et al.* ya había sido mencionada por Rutten *et al.* Con la información aportada en la presente tesis, se añaden otros dos artículos referentes a la misma mutación y un total de cuatro pacientes nuevos.
- La mutación p.R213K. Rutten *et al.* no la consideraron patogénica al no haberse demostrado co-segregación familiar. Sin embargo, en el caso de la presente tesis, no se considera este un criterio excluyente, como se ha discutido previamente.
- La mutación p.R61W. Rutten *et al.* no la habían considerado patogénica, puesto que el tipo de técnica empleada para la detección de la mutación no se había especificado, por lo que esta podría no haber sido lo suficientemente sensible y por tanto no haber detectado mutaciones que afectasen el número de cisteínas del receptor.
- La mutación p.D80G. No había sido descrita en el trabajo de Rutten *et al.*, pero aplicando sus criterios y los de la presente tesis, esta mutación se consideraría patogénica.

En varios de los artículos revisados, se describen estudios bioinformáticos o funcionales realizados con las mutaciones reportadas, para poder explicar una posible relación causal (39,243) con CADASIL, concretamente:

- Mizuno *et al.* sugirieron que en el caso de p.R75P, los cambios en la estructura de Notch3 podrían estar relacionados con el reemplazo de un aminoácido por prolina, ya que los estudios de estructura tridimensional demostraron que la prolina ayuda a estabilizar la lámina β (239,254). Por tanto, esto puede dar lugar a un cambio conformacional en la proteína y alterar el sitio de unión del receptor o la exposición de los sitios de escisión proteolítica del receptor, entre otros.
- Otro estudio observó que varias de estas mutaciones atípicas (R107W, S497L, E813K, A1020P, S978R e His1133E), estaban asociadas con cambios estructurales en el receptor Notch3 (39), similar al mecanismo observado para las mutaciones que afectaban al número de cisteínas. Por lo tanto, no sólo el cambio del aminoácido cisteína, sino también el de otros, podrían conducir al plegamiento incorrecto del receptor.
- Estudios *in vitro* con p.R75P, p.D80G y delta88-91 han demostrado un aumento de la agregación del receptor, similar al ocasionada cuando se produce una mutación que afecta al número de cisteínas en Notch3 (240).

6.1.1. LIMITACIONES

Como limitaciones de este estudio, hay que considerar el bajo número de casos descritos hasta la fecha, así como la alta frecuencia de este tipo de mutaciones en asiáticos, que podría incurrir en sesgos ante las diferentes características en esta población (mayor frecuencia de sangrados, menor afectación del polo temporal...). Para evitar esta última limitación, se comparó una de las características más relevantes en la neuroimagen de estos pacientes, la afectación del polo temporal. Como se citó anteriormente, la prevalencia de la alteración de esta región anatómica en asiáticos, como mínimo alcanza el 45%, por lo que cabría esperar 4-5 pacientes afectados entre los diez casos índice con las mutaciones consideradas patogénicas; sin embargo, sólo uno de ellos presentó WMH en el polo temporal.

Otra limitación, como ya exponían Rutten *et al.*, es el hecho del empleo de SSCP para la detección de la mutación de p.R213K (242), que podría haber sido poco sensible para encontrar otras mutaciones. Como se indicó en la introducción, este tipo de técnica tiene una sensibilidad para la detección de mutaciones entre el 80-85% (180), a diferencia de

la secuenciación *Sanger*, actualmente más habitual y fiable. En el caso de p.R61W, no se especificó la técnica de análisis genético.

Otra limitación de este estudio fue la combinación de mutaciones ECD y ICD del receptor. El objetivo era revisar si mutaciones puntuales en el gen *NOTCH3*, que no afectasen a residuos cisteína en el receptor, en pacientes con clínica característica de CADASIL, podrían considerarse patogénicas, independientemente del dominio afectado. Asimismo, todas las mutaciones consideradas patogénicas se han localizado en exones que codificaban para el ECD de Notch3.

6.2. ESTUDIO DE LOS ARNm DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LAS BIOPSIAS DE PIEL DE PACIENTES CON CADASIL Y CONTROLES

El estudio de los ARNm diferencialmente expresados en las biopsias de piel de pacientes con CADASIL, comparado con controles voluntarios, se realizó mediante la técnica de microarrays, con cuatro pacientes con CADASIL y tres controles, pertenecientes a tres familias diferentes. Su validación, mediante la técnica de qRT-PCR, se realizó a diez pacientes con CADASIL y ocho controles.

En el GWTS no se encontró la presencia de ningún ARNm diferencialmente expresado asociado a CADASIL, de forma estadísticamente significativa, tras la corrección por múltiples comparaciones. Sin embargo, de los 15 primeros ARNm diferencialmente expresados cuya significancia era más elevada, se escogieron aquellos con un valor de $<1,0 \times 10^{-3}$ (*BANP* y *PDCD6IP*) y aquellos en los que en la literatura se habían asociado a la isquemia neuronal (*CAMK2G* y *E2F4*). El motivo de la búsqueda de esta asociación, radica en la existencia de una hipoperfusión ya en estadios tempranos de la enfermedad (99,100), siendo los pequeños infartos cerebrales, secundarios a una isquemia aguda, y las WMH, secundarias a una isquemia crónica cerebral, una de las características más destacables del CADASIL.

Tras el análisis mediante la técnica de qRT-PCR, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre *E2F4* y CADASIL, encontrándose sobreexpresado en pacientes con esta enfermedad, al igual que lo que ocurría en el estudio de GWTS.

Por otra parte, la evaluación del perfil cognitivo en cinco de los pacientes con CADASIL, del estudio con la técnica de qRT-PCR, puso de manifiesto que la sobreexpresión de *E2F4* se correlacionaba de forma significativa con un peor rendimiento en las pruebas que evaluaban la función ejecutiva, y tendencia en las pruebas que evalúan la atención y VPI.

La importancia de su asociación con la función ejecutiva, y la atención y VPI, radica en que son las principales funciones alteradas en el CADASIL (146). Por ello, como se ha indicado en la introducción, los test centrados en la evaluación de estas dos funciones, son especialmente útiles para la identificación temprana del deterioro cognitivo y monitorización del paciente con CADASIL (146,148). Por tanto, un ARNm u otra

molécula asociada a estos dos dominios cognitivos podría ser útil como biomarcador y monitorización de la evolución de la enfermedad.

Asimismo, se ha comprobado a través del portal de GTEx que *E2F4* se expresa en el cerebro, y gracias a su estudio a través del portal de *Single-Nuclei Brain RNA-seq*, se ha demostrado que se expresa en diversos tipos celulares, incluidas las células endoteliales cerebrales, las cuales son de gran relevancia para la enfermedad. Estas células se han visto alteradas en CADASIL en los estudios histopatológicos (42,51,52), y están involucradas en la autorregulación del flujo sanguíneo, mecanismo que se ha visto alterado en numerosos estudios centrados en el CADASIL (101–103).

La proteína E2F4 pertenece a la familia de factores de transcripción E2F y juega un papel crucial en el control del ciclo celular. Estudios previos (218), han puesto de manifiesto que, las células precursoras de las células granulosas del cerebelo, infectadas con un adenovirus que expresaba *E2F4*, frente a los controles, tenían una mayor supervivencia tras un evento isquémico. Además, se encontró que, los niveles de *E2F4* disminuían después de la hipoxia en estos tipos celulares no infectados. Asimismo, la sobreexpresión de *E2F4* no tenía ningún efecto sobre la viabilidad neuronal en ausencia de isquemia.

Por otra parte, E2F4 forma parte de un complejo que contiene Smad3, y que actúan como transductores de las señales del transforming growth factor- β (TGF β) (255). TGF β es una proteína relacionada con las enfermedades de pequeño vaso cerebrales hereditarias (256), como el CARASIL, causado por mutaciones en el gen *HTRA1*. El sustrato de la Htra1 es el LTBP-1, y al hallarse alterada, acaba produciendo un aumento del TGF β , encontrándose aumentada su vía de señalización (257). En el CADASIL, se ha puesto de manifiesto que, tanto el LTBP-1 (48), como el Htra1, se encuentran asociados a los depósitos del ECD de Notch3. Asimismo, esta última proteína, se ha mostrado con una menor actividad en pacientes con CADASIL (258). Por tanto, E2F4 podría estar indicando una sobreactivación de la vía de TGF β en pacientes con CADASIL.

Con este trabajo se ha puesto de manifiesto que la sobreexpresión de *E2F4* se asocia a los pacientes con CADASIL y con un peor rendimiento en las pruebas que valoran los dominios característicamente alterados en esta enfermedad (función ejecutiva y atención y VPI), aportando información sobre posibles mecanismos etiopatogénicos en esta enfermedad, y sugiriendo que el uso del ARNm de *E2F4* podría ser útil como marcador

cognitivo en el CADASIL y monitorización de la enfermedad. Para verificar la utilidad como biomarcador del ARNm de *E2F4*, así como para dilucidar si *E2F4* es causa o efecto de la presencia del CADASIL, sería necesario la realización de nuevos estudios con un mayor número de pacientes, donde estos resultados se replicasen.

6.2.1. LIMITACIONES

Como limitación principal encontramos el pequeño tamaño muestral. Esto es consecuencia del estudio de una enfermedad rara. El apareamiento por edad y sexo, así como el estudio entre familiares en el GWTS, permiten minimizar los sesgos en la interpretación de los resultados.

Por otra parte, la falta del análisis directo de las células principalmente involucradas en la patología, como son las células vasculares cerebrales, disminuye la potencia del estudio; desafortunadamente, la obtención de estas, en una enfermedad de baja prevalencia, y cuyo análisis se relega principalmente al estudio necrótico, lo hace complicado. Asimismo, el análisis de muestras de tejido cerebral en los estudios de necropsia presenta otros inconvenientes técnicos como, por ejemplo, el tiempo en la obtención de la muestra desde el fallecimiento del paciente, lo cual influye en la expresión génica.

Como se describió en la introducción de la presente tesis, el CADASIL es una arteriopatía sistémica. Tanto en las biopsias de piel, músculo o cerebro, pueden evidenciarse en los vasos sanguíneos las alteraciones histopatológicas características del CADASIL, como la alteración de las células endoteliales, VSMC y pericitos, la alteración de las uniones celulares con la matriz extracelular, o la agregación del ECD de Notch3 (42,51,52). Por ello, debido al carácter sistémico de la enfermedad, y a la aparición de las características histopatológicas del CADASIL en las biopsias de piel, estas se han considerado útiles para la búsqueda de ARNm diferencialmente expresados en pacientes con CADASIL y, por tanto, relevantes para la enfermedad.

Como se ha comentado anteriormente, el estudio GWTS no presentó ARNm diferencialmente expresados, asociados de forma significativa a CADASIL, tras ajustarlo por pruebas de corrección por múltiples comparaciones. Los estudios de datos masivos, como el análisis transcriptómico de diversos tipos celulares, con un número reducido de muestras (secundario a la baja prevalencia del CADASIL), pueden tener la

inconveniencia de presentar un poder menor para detectar significancias estadísticas, cuando existen diferencias pequeñas, aun siendo determinantes, y que análisis masivos como el GWTS puede enmascarar. Por ello, la elección de aquellos ARNm asociados a CADASIL de forma más significativa en el GWTS, para su evaluación mediante la técnica de qRT-PCR, puede ser una aproximación útil y válida. Estudios genéticos en CADASIL también han tenido que recurrir al uso de datos no significativos, obteniendo posteriormente datos de interés científico, para lidiar con esta falta de poder, debido al análisis de datos masivos en enfermedades raras. Como ejemplo, Opherk *et al.* realizaron un *Genome-Wide Association Study* (GWAS) para la búsqueda de SNPs que pudieran estar asociados a la WMH en pacientes con CADASIL. No encontraron ningún SNP significativo, pero la creación de un score poligénico a partir de aquellos más significativos, sí se asoció al volumen de WMH; sugiriendo que múltiples SNPs con pequeños efectos modifican la carga total de WMH en pacientes con CADASIL, en lugar de hacerlo SNPs con efectos mayores (259).

6.3. CREACIÓN DE UN MODELO PRONÓSTICO PARA ESTIMAR LA DISCAPACIDAD AL TERCER MES DE HABER PADECIDO UN ICTUS ISQUÉMICO Y SU UTILIDAD EN PACIENTES CON CADASIL

Debido a la gran variedad fenotípica existente entre los pacientes con CADASIL, incluso siendo portadores de una misma mutación, dentro de una misma familia, y aun siendo gemelos monocigotos (187,188), la predicción de la evolución de los pacientes es difícil de precisar.

Por ello, y debido a que los pequeños infartos subcorticales son uno de los mayores predictores de deterioro clínico en CADASIL (149), uno de los objetivos de esta tesis ha sido la creación de un modelo capaz de estimar la evolución de un paciente, tras un ictus isquémico. Por tanto, con la creación del *Parsifal Score*, a partir de una regresión logística ordinal multivariable, se puede predecir la discapacidad y mortalidad de un paciente al tercer mes de haber padecido un ictus isquémico, durante las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas del evento vascular, no habiendo sido sometido a tratamiento recanalizador. Y este modelo es útil para la valoración de pacientes con un ictus isquémico y CADASIL.

Asimismo, este modelo predictivo, cumple los criterios propuestos por Sim *et al.* (235):

- Discriminación. El *Parsifal Score* es capaz de predecir:
 - La discapacidad al tercer mes de un ictus isquémico, con una precisión del 80%, un AUC de 0,86, una especificidad del 90% y una sensibilidad del 64%, en la cohorte de descubrimiento. En la cohorte de replicación, obtuvo una precisión del 76%, un AUC del 0,86, una especificidad del 80% y una sensibilidad del 74%. A la hora de predecir la discapacidad al tercer mes en los cinco pacientes con un ictus isquémico y CADASIL, obtuvo una precisión del 80% (4/5). En el paciente con CADASIL cuya estimación fue incorrecta, cabe mencionar que presentaba un Síndrome de Emergencia Capsular. Este, se define como la presencia de episodios estereotipados de AIT, con un riesgo aumentado de padecer un infarto cerebral establecido (260). El *Parsifal Score* no es un modelo diseñado

para predecir esta clase de síndromes, además de no haber incluido en su modelo a pacientes con AIT. Por tanto, es un caso especial de ictus en el que probablemente el *Parsifal Score* no es efectivo.

- La mortalidad al tercer mes de un ictus isquémico, con un AUC de 0,88, una especificidad del 97% y una sensibilidad del 38%, en la cohorte de descubrimiento. En la cohorte de replicación se obtuvo un AUC de 0,82, una especificidad del 93% y una sensibilidad del 46%. No se disponía de datos suficientes para la evaluación de la mortalidad en pacientes con ictus y CADASIL.
- Calibración. La presencia de la prueba de Lipsitz no significativa, demuestra la bondad del ajuste.
- Parsimonia. El *Parsifal Score* puede obtenerse con tan solo cinco simples variables, y que pueden conocerse durante las primeras horas en las que el paciente es admitido en urgencias: edad, mRS inicial, NIHSS inicial, concentración de la glicemia inicial e historia de dislipemia.
- Practicidad. La herramienta web generada hace que el *Parsifal Score* sea fácil de utilizar.

Por tanto, puede decirse que el modelo tiene una buena discriminación, es calibrado, parsimonioso y práctico, gracias a la implementación del *Parsifal Score* en una aplicación web. Además, la predicción de la discapacidad tiene niveles de especificidad buenos, siendo $\geq 80\%$ en las tres cohortes y para la mortalidad $>90\%$. Tanto para la discapacidad como para la mortalidad, la sensibilidad fue más baja. Por ello, a la hora de interpretar los resultados del modelo, y darlos a conocer a los pacientes y familiares, hay que tener en cuenta su alta especificidad, pero baja sensibilidad. Cabe destacar que, entre los diferentes subtipos de infarto cerebral, el *Parsifal Score* es igual de efectivo en todos ellos.

Las variables significativamente asociadas a la discapacidad al tercer mes, y que forman parte del *Parsifal Score* fueron la edad, mRS inicial, NIHSS inicial, glicemia inicial y el tener antecedentes de dislipemia. Es interesante destacar que, en el modelo obtenido, el padecer dislipemia suponía un factor protector. En los últimos años, el manejo de la

hipercolesterolemia ha sido cuestionada, ya que la contribución de los niveles de LDL a los eventos cardiovasculares es controvertida (261). Por otra parte, es conocido el efecto positivo del tratamiento con estatinas en la recuperación tras un ictus (262); desafortunadamente, no se disponía de una variable que especificase el tipo de tratamiento hipolipemiante, por lo que este efecto no puede ser estimado. De la misma manera, al no ser un modelo obtenido a partir, exclusivamente, de pacientes con CADASIL, no se puede concluir que la dislipemia o el tratamiento con estatinas, sea protector en este grupo de pacientes. De hecho, en pacientes con CADASIL se estudió si la atorvastatina podía producir cambios en la hemodinamia cerebral a corto plazo, no encontrando tal evidencia (199). Son necesarios estudios dirigidos a evaluar la asociación entre las estatinas y la discapacidad tras un ictus en pacientes con CADASIL.

Por otra parte, actualmente existen varios modelos para predecir discapacidad al tercer mes de haber presentado un infarto cerebral. Sin embargo, no todos cumplen los criterios propuestos por Sim *et al.* (263).

Recientemente, se han evaluado los que se consideran los tres modelos principales para predecir la discapacidad tras un ictus: el iScore, el PLAN Score y el ASTRAL Score (264). Se llegó a la conclusión de que los tres modelos tienen la misma capacidad de predecir un mal pronóstico y mortalidad a los seis meses en pacientes con un ictus isquémico.

Asimismo, uno de los últimos modelos publicados ha sido el DSS, obtenido a partir de una regresión logística ordinal multivariable. Su intención era predecir la discapacidad y el estado funcional al tercer mes, de un paciente que había padecido un ictus isquémico. Las variables del DSS eran las siguientes: la edad por década superior a 60 años, NIHSS, DM, ictus previo y FA (230).

Comparando los cuatro modelos anteriormente mencionados:

- El iScore precisa 12 variables para obtener una discriminación para estimar dependencia con un AUC de 0,79 en su cohorte de descubrimiento y 0,68 en su cohorte de replicación.

- El ASTRAL Score precisa siete variables para obtener una discriminación con un AUC de 0,85 en su cohorte de descubrimiento y 0,94 y 0,77 en sus cohortes de replicación.
- El PLAN Score evalúa el pronóstico favorable (mRS <3) y desfavorable (mRS 5-6), al mes en lugar de a los tres meses. Precisa siete variables para una discriminación medida con el AUC de 0,77 en la cohorte de descubrimiento y de 0,80 en la cohorte de replicación.
- El DSS, obtenido a partir de una regresión logística ordinal multivariable, precisa cinco variables para obtener una discriminación con el AUC de 0,75 en su cohorte de descubrimiento y 0,74 y 0,69 en sus cohortes de replicación.

El DSS es el único cuya aproximación para la estimación del *score* se sirve de un modelo ordinal (aunque no especifica si se cumple el supuesto para su aplicación). Es tan parsimonioso como el *Parsifal Score*, requiriendo cinco variables para obtener una discriminación con un AUC de 0,75, inferior al obtenido en el modelo de la presente tesis (0,86). Cabe destacar que, la aplicación de ambos modelos a la cohorte de replicación de este trabajo arrojaba diferencias significativas en el AUC, ofreciendo una mejor discriminación con el *Parsifal Score* (AUC de 0,86 vs 0,79). Por otra parte, en el DSS no se hace mención de su sensibilidad y/o especificidad, ni proporciona una herramienta que facilite su uso en la práctica clínica diaria.

Respecto a la estimación de la mortalidad, con el *Parsifal Score* se obtiene un AUC de mayor valor con respecto al resto de modelos: de 0,88 en la cohorte de descubrimiento, y 0,82 en la cohorte de replicación; el *iScore* de 0,83 en la cohorte de descubrimiento y de 0,74 en la cohorte de replicación; y el PLAN Score de 0,85 en la cohorte de descubrimiento y 0,87 en la cohorte de replicación.

Por tanto, comparándolo con los modelos anteriores, el *Parsifal Score* presenta el valor de AUC más alto obtenido en una cohorte de descubrimiento, con el menor número de variables posible (12). Asimismo, estos modelos publicados en la literatura incluyen variables que sobrerrepresentan la enfermedad de gran vaso, como el padecer fibrilación auricular, presentar hemianopsia homónima o alteración del nivel de conciencia, que aun pudiéndose dar en pequeños infartos subcorticales, son síntomas mucho menos frecuentes y, por tanto, estos modelos podrían ser menos útiles que el *Parsifal Score*, para predecir

el pronóstico en pacientes con CADASIL. Además, se ha puesto de manifiesto que, el *Parsifal Score* estima el pronóstico de un paciente tras un ictus, independientemente de su etiología.

En la Tabla 18 se esquematiza la comparativa entre los cuatro modelos discutidos y el *Parsifal Score*. Con este tipo de modelos se pretende poder asesora a los pacientes, familiares y/o cuidadores, del estado funcional del paciente con CADASIL, y así tomar conciencia de las posibles medidas que deben llevar a cabo en un futuro, como pudiera ser la adaptación del hogar del paciente, evitando barreras arquitectónicas. Asimismo, puede ayudar a guiar la planificación de la rehabilitación al alta hospitalaria, identificando a aquellos pacientes tributarios de una rehabilitación más intensiva, especialmente en países con recursos económicos menores, y que precisen de un uso más racionalizado de los recursos. Por ejemplo, los pacientes a los que se estimase un mRS entre 2 y 4, podrían beneficiarse de una rehabilitación especial e intensiva, y no tanto aquellos con un mRS estimado >4. Estos modelos también tienen su interés para la selección de pacientes para ensayos clínicos, centrados en resultados a largo plazo o tratamientos neuroprotectores, sobre todo en patologías sin tratamiento específico como el CADASIL.

Este *score* simple podría implementarse fácilmente en la práctica clínica diaria gracias a la herramienta web creada y su parsimonia.

5.3.1. LIMITACIONES

Una de las principales limitaciones es el escaso número de pacientes con CADASIL para conocer el alcance real de la fiabilidad del *Parsifal Score* en esta población. Asimismo, la ausencia de comparación entre el modelo creado y los principales modelos pronósticos publicados, debido a la falta de información de todas las variables, no permite una correcta comparativa. Sin embargo, en base a la AUC de las cohortes de replicación en pacientes con ictus isquémico, el *Parsifal Score* parece presentar una mejor discriminación.

Por otra parte, este modelo no se ha evaluado en pacientes sometidos a tratamiento de recanalización o pacientes con AIT, por lo que el *Parsifal Score* podría no ser adecuado para la valoración de estos pacientes, así como tampoco parece serlo en aquellos con un Síndrome de Emergencia Capsular.

Como en la mayoría de los modelos, el *Parsifal Score* es más preciso en la cohorte de descubrimiento que en la cohorte de replicación. Una explicación de ello podría ser que, los pacientes en de la cohorte de replicación son estadísticamente diferentes a los de la cohorte de descubrimiento en variables relevantes para el modelo, como son el NIHSS inicial, el mRS previo, la presencia de dislipemia y el mRS a los tres meses. Los pacientes en la cohorte de replicación tienen un NIHSS más grave, un peor mRS inicial, una mayor proporción de dislipemia, y un peor mRS a los tres meses. Importante remarcar que, el *Parsifal Score* es más preciso en pacientes con mejor mRS previo y mejor NIHSS inicial, lo que podría explicar el motivo por el cual los resultados en la cohorte de replicación son menos precisos.

Es necesaria la realización de más estudios con diferentes poblaciones y subgrupos, y muestras de mayor tamaño, para representar mejor la variedad de los eventos isquémicos vasculares y así ajustar mejor los modelos para obtener resultados más precisos y fiables. Debido a la falta de precisión del 100%, se debe advertir a los pacientes sobre la posibilidad de una estimación incorrecta del estado funcional después del ictus.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. p.R61W, p.R75P, p.D80G y p.R213K, pueden ser consideradas mutaciones patogénicas y causantes del CADASIL. Asimismo, los pacientes con estas mutaciones presentan una menor afectación del polo temporal en la RMN. Mecanismos adicionales a la aparición de un número impar de cisteínas en Notch3 pueden ser responsables de la aparición de esta enfermedad.
2. Existe una sobreexpresión de *E2F4* en pacientes con CADASIL con respecto a controles. Entre los pacientes con CADASIL, existe una correlación negativa significativa entre la sobreexpresión de *E2F4* y el rendimiento en la valoración de la función ejecutiva y, una tendencia en la correlación negativa con la atención y VPI.
3. El *Parsifal Score* es:
 - a. Un modelo con buena discriminación, parsimonioso y calibrado, para predecir el pronóstico a los tres meses, en un paciente con un ictus isquémico.
 - b. En los pacientes con ictus isquémico y CADASIL, predice de forma eficaz el pronóstico a los tres meses.
 - c. La implementación mediante una herramienta web facilitará su uso en la práctica clínica diaria.

LÍNEAS DE FUTURO

8. LÍNEAS DE FUTURO

Teniendo en cuenta las conclusiones del trabajo de la presente tesis, se desprenden varias líneas de futuro. Por apartados encontramos:

1. p.R61W, p.R75P, p.D80G y p.R213K, pueden ser consideradas mutaciones patogénicas y causantes del CADASIL.
 - Para apoyar esta conclusión, sería útil la creación de modelos animales con cada una de las mutaciones. Ello permitiría evaluar las características histológicas típicas de CADASIL y ver si existe alguna diferenciadora; así como estudiar la autorregulación cerebral, alterada en modelos animales de esta enfermedad.
 - Por otra parte, la comparativa de modelos animales con estas mutaciones, las mutaciones que afectan a residuos cisteína en las EGFr, y las mutaciones descritas que afectan al dominio intracelular del receptor, permitiría ahondar en los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad.
2. Existe una sobreexpresión de *E2F4* en pacientes con CADASIL con respecto a controles, y esta se correlaciona negativamente con el rendimiento en las pruebas que evalúan la función ejecutiva y la atención y VPI.
 - Para apoyar esta conclusión, sería conveniente replicar el estudio en un número mayor de individuos. Asimismo, para facilitar su uso como eventual biomarcador del estado cognitivo del paciente y/o monitorización de la enfermedad para futuros ensayos clínicos, sería útil valorar si la expresión de *E2F4* en sangre se correlaciona de la misma manera que sus niveles en las biopsias de piel, ya que la muestra sería de más fácil obtención. Para ello sería necesario un estudio con un tamaño muestral suficiente y replicarlo en una nueva cohorte de pacientes; así como estudios estadísticos específicos para el análisis de biomarcadores.
 - El estudio transcriptómico ha mostrado que *E2F4* puede ser relevante en la enfermedad. Por tanto, el estudio transcriptómico por grupos celulares, evaluando de forma detenida aquellas directamente relacionadas con la

enfermedad, como las células endoteliales, las VSMC y los pericitos, a través de un *Single nuclei RNA-Seq* podrá proporcionar una información de valioso interés científico.

3. El *Parsifal Score* es un modelo eficaz para predecir la evolución de los pacientes tras un ictus isquémico, incluso en aquellos con CADASIL.

- Podría plantearse un estudio en el que se comparase el pronóstico de los pacientes sometidos a rehabilitación intensiva *vs* tratamiento estándar rehabilitador, en aquellos pacientes con un *Parsifal Score* estimado entre 2-4 para comprobar si existen diferencias significativas, y su implementación mejorase la calidad de vida de estos pacientes de forma eficiente.
- La dislipemia mostró un carácter protector del pronóstico tras un ictus isquémico en pacientes no sometidos a tratamiento re canalizador. Sería interesante plantear un estudio futuro para valorar si en concreto, pacientes con CADASIL también presentan esta asociación, y si esta es debida al hecho de padecer dislipemia o de estar bajo tratamiento hipolipemiente. En caso de encontrar asociación con el uso de estatinas, serían necesarios más estudios dirigidos para una mejor evaluación, como pudieran ser ensayos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Coto E, Menéndez M, Navarro R, García-Castro M, Alvarez V. A new de novo Notch3 mutation causing CADASIL. *Eur J Neurol*. 2006 Jun;13:628–31.
2. Ruchoux M, Maurice C. CADASIL : Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. 1997.
3. Tournier-Lasserre E, Iba-Zizen MT, Romero N, Bousser MG. Autosomal dominant syndrome with stroke-like episodes and leukoencephalopathy. *Stroke*. 1991;22:1297–302.
4. Marie-Magdeleine Ruchoux, Hugues Chabriat, Marielle Baudrimont ET-L. Presence of Ultrastructural Arterial Lesions in Muscle and Skin Vessels of Patients With CADASIL. *Stroke*. 1994;25:2291–3.
5. Chabriat H, Vahedi K, Iba-Zizen MT, Joutel A, Nibbio A, Nagy TG, et al. Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet*. 1995;346:934–9.
6. M. Liguori, R. Mazzei, C. Ungaro, I.L. Simone, A. Gambardella, I. Plasmati, F. Fera, U. Aguglia, P. Lanza, F. Bono, L. Chiumarulo, F.L. Conforti, D. Consoli AQ. Conventional MRI and NOTCH3 gene screening in sporadic CADASIL. 2009;72:469–72.
7. Markus HS, Martin RJ, Simpson MA, Dong YB, Ali N, Crosby AH, et al. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology*. 2002;59:1134–8.
8. 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 to chromosome 19q12. *Nat Genet*. 1993;3:256–9.
9. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, et al. Joutel et al., Nature 1996, Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia.pdf. *Nature*. 1996;383:707–10.
10. Hemelsoet D, Hemelsoet K, Devreese D. The neurological illness of Friedrich Nietzsche. *Acta Neurol Belg*. 2008;108:9–16.
11. Razvi SMM, Davidson R, Bone I, Muir KW. The prevalence of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) in the west of Scotland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:739–41.

12. Narayan SK, Kalaria RN. The minimum prevalence of CADASIL in Northeast England. 2012;32:76–8.
13. Moreton FC, Razvi SSMM, Davidson R, Muir KW. Changing clinical patterns and increasing prevalence in CADASIL. *Acta Neurol Scand*. 2014;130:197–203.
14. Bianchi S, Zicari E, Carluccio A, Di Donato I, Pescini F, Nannucci S, et al. CADASIL in central Italy: A retrospective clinical and genetic study in 229 patients. *J Neurol*. 2015;262:134–41.
15. Rutten JW, Dauwerse HG, Gravesteijn G, Belzen MJ Van, Grond V Der, Polke JM, et al. Archetypal NOTCH3 mutations frequent in public exome: implications for CADASIL. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016;3:844–53.
16. Rutten JW, Eijdsden BJ Van, Duering M, Jouvent E, Opherck C, Pantoni L, et al. The effect of NOTCH3 pathogenic variant position on CADASIL disease severity : NOTCH3 EGFr 1 – 6 pathogenic variant are associated with a more severe phenotype and lower survival compared with EGFr 7 – 34 pathogenic variant. *Genet Med*. 2018;0:6–11.
17. Dong Y, Hassan A, Zhang Z, Huber D, Dalageorgou C, Markus HS. Yield of screening for CADASIL mutations in lacunar stroke and leukoaraiosis. *Stroke*. 2003;34:203–5.
18. Kilarski LL, Rutten-Jacobs LCA, Bevan S, Baker R, Hassan A, Hughes DA, et al. Prevalence of CADASIL and fabry disease in a cohort of MRI defined younger onset Lacunar Stroke. *PLoS One*. 2015;10:1–11.
19. Chong M, O'Donnell M, Thijs V, Dans A, López-Jaramillo P, Gómez-Arbelaez D, et al. Mendelian Genes and Risk of Intracerebral Hemorrhage and Small-Vessel Ischemic Stroke in Sporadic Cases. *Stroke*. 2017;48:2263–5.
20. Spinner NB. CADASIL: Notch signaling defect or protein accumulation problem? *J Clin Invest*. 2000;105:561–2.
21. Egan SE, St-Pierre B, Leow CC. Notch receptors, partners and regulators: From conserved domains to powerful functions. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1997;228:273–324.
22. Arboleda-Velasquez JF, Rampal R, Fung E, Darland DC, Liu M, Martinez MC, et al. CADASIL mutations impair Notch3 glycosylation by Fringe. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1631–9.
23. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci*. 2002;115:1095–7.

24. Tang S-C, Jeng J, Lee M, Yip P-K. Notch signaling and CADASIL. *Acta Neurol Taiwan*. 2009 Jul;18:81–90.
25. Niessen K, Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;293.
26. Lasky JL, Wu H. Notch Signaling, Brain Development, and Human Disease. *Pediatr Res*. 2005;57:104R-109R.
27. Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E. Pathogenic Mutations Associated with Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy Differently Affect Jagged1 Binding and Notch3 Activity via the RBP/JK Signaling Pathway. *Am J Hum Genet*. 2004;74:338–47.
28. Smallridge RS, Whiteman P, Doering K, Handford PA, Downing AK. EGF-like domain calcium affinity modulated by N-terminal domain linkage in human fibrillin-1. *J Mol Biol*. 1999;286:661–8.
29. Gordon WR, Roy M, Vardar-Ulu D, Garfinkel M, Mansour MR, Aster JC, et al. Structure of the Notch1-negative regulatory region: Implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood*. 2009;113:4381–90.
30. Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. Notch Subunit Heterodimerization and Prevention of Ligand-Independent Proteolytic Activation Depend, Respectively, on a Novel Domain and the LNR Repeats. *Mol Cell Biol*. 2004;24:9265–73.
31. Tiyanont K, Wales TE, Siebel CW, Engen JR BS. Insights into Notch3 Activation and Inhibition Mediated by Antibodies Directed Against its Negative Regulatory Region. *J Mol Biol*. 2013;425:3192–204.
32. Manuscript A. Lysosome-dependent degradation of Notch3. 2010;41:2594–8.
33. Bellavia D, Checquolo S, Campese AF, Felli MP, Gulino A, Screpanti I. Notch3: From subtle structural differences to functional diversity. *Oncogene*. 2008;27:5092–8.
34. Wang W, Prince CZ, Mou Y, Pollman MJ. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277:21723–9.
35. Joutel A. Pathogenesis of CADASIL: Transgenic and knock-out mice to probe function and dysfunction of the mutated gene, Notch3, in the cerebrovasculature. *BioEssays*. 2011;33:73–80.

36. Wang YY, Pan LY, Moens CB, Appel B. Notch3 establishes brain vascular integrity by regulating pericyte number. *Dev.* 2014;141:307–17.
37. Maio G Di, Formichi P, Radi E, Bianchi S, Onnis A, Leoncini L, et al. Human peripheral blood lymphocytes and fibroblasts as Notch3 expression models. *J Cell Physiol.* 2012;227:1771–5.
38. Dichgans M, et al. Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. *Eur J Hum Genet.* 2000;8:280–5.
39. Vlachakis D, Tsaniras SC, Ioannidou K, Baumann M, Kossida S. Research Article A series of Notch3 mutations in CADASIL; insights from 3D molecular modelling and evolutionary analyses. 2014.
40. Monet-Leprêtre M, Haddad I, Baron-Menguy C, Fouillot-Panchal M, Riani M, Domenga-Denier V, et al. Abnormal recruitment of extracellular matrix proteins by excess Notch3 ECD: A new pathomechanism in CADASIL. *Brain.* 2013;136:1830–45.
41. Joutel A, Monet-leprêtre M, Gosele C, Baron-Menguy C, Hammes A, Schmidt S, et al. Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J Clin Invest.* 2010;120:433–45.
42. Ruchoux MM, Maurage CA. Endothelial changes in muscle and skin biopsies in patients with CADASIL. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24:60–5.
43. Baron-Menguy C, Domenga-Denier V, Ghezali L, Faraci FM, Joutel A. Increased Notch3 Activity Mediates Pathological Changes in Structure of Cerebral Arteries. *Hypertension.* 2017;69:60–70.
44. Dong H, Ding H, Young K, Blaivas M, Christensen PJ WM. Advanced intimal hyperplasia without luminal narrowing of leptomeningeal arteries in CADASIL. *Stroke.* 2013;44:1456–8.
45. Ratzinger G, Ransmayr G, Romani N, Zelger B. CADASIL - An unusual manifestation with prominent cutaneous involvement. *Br J Dermatol.* 2005;152:346–9.
46. Lewandowska E, Felczak P, Buczek J, Gramza K, Rafałowska J. Blood vessel ultrastructural picture in a CADASIL patient diagnosed at an advanced age. *Folia Neuropathol.* 2014;52:443–51.
47. Okeda R, Arima K, Kawai M. Arterial changes in cerebral autosomal dominant

- arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) in relation to pathogenesis of diffuse myelin loss of cerebral white matter: Examination of cerebral medullary arteries by reconstruct. *Stroke*. 2002;33:2565–9.
48. Kast J, Hanecker P, Beaufort N, Giese A, Joutel A, Dichgans M, et al. Sequestration of latent TGF- β binding protein 1 into CADASIL-related Notch3-ECD deposits. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:1–12.
 49. Miao Q, Kalimo H, Bogdanovic N, Kostulas K, Börjesson-Hanson A, Viitanen M. Cerebral arteriolar pathology in a 32-year-old patient with CADASIL. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006;32:455–8.
 50. Ping S, Qiu X, Gonzalez-Toledo ME, Liu X, Zhao LR. Stem Cell Factor in Combination with Granulocyte Colony-Stimulating Factor reduces Cerebral Capillary Thrombosis in a Mouse Model of CADASIL. *Cell Transplant*. 2018;27:637–47.
 51. Lewandowska E, Leszczyńska A, Wierzb-Bobrowicz T, Skowrońska M, Mierzevska H, Pasennik E, et al. Ultrastructural picture of blood vessels in muscle and skin biopsy in CADASIL. *Folia Neuropathol*. 2006;44:265–73.
 52. Ghosh M, Balbi M, Hellal F, Dichgans M, Lindauer U, Plesnila N. Pericytes are involved in the pathogenesis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Ann Neurol*. 2015;78:887–900.
 53. Brulin P, Godfraind C, Leteurtre E, Ruchoux MM. Morphometric analysis of ultrastructural vascular changes in CADASIL: Analysis of 50 skin biopsy specimens and pathogenic implications. *Acta Neuropathol*. 2002;104:241–8.
 54. Tikka S, Peng Ng Y, Di Maio G, Mykkänen K, Siitonen M, Lepikhova T, et al. CADASIL mutations and shRNA silencing of NOTCH3 affect actin organization in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:2171–80.
 55. Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, Tournier-Lasserre E, et al. Transgenic mice expressing mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Am J Pathol*. 2003;162:329–42.
 56. Dziewulska D, Nycz E. Disturbed integrin expression in the vascular media in CADASIL. *Folia Neuropathol*. 2016;54:375–81.
 57. Lewandowska E, Szpak GM, Wierzb-Bobrowicz T, Modzelewska J, Stępień T,

- Pasennik E, et al. Capillary vessel wall in CADASIL angiopathy. *Folia Neuropathol.* 2010;48:104–15.
58. Dziewulska D, Lewandowska E. Pericytes as a new target for pathological processes in CADASIL. *Neuropathology.* 2012;32:515–21.
 59. Craggs LJJ, Fenwick R, Oakley AE, Ihara M, Kalaria RN. Immunolocalization of platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β) and pericytes in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41:557–70.
 60. Opherk C, Duering M, Peters N, Karpinska A, Rosner S, Schneider E, et al. CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3. *Hum Mol Genet.* 2009 Aug 1;18:2761–7.
 61. Meng H, Zhang X, Yu G, Lee SJ, Chen YE, Prudovsky I, et al. Biochemical Characterization and Cellular Effects of CADASIL Mutants of NOTCH3. *PLoS One.* 2012;7:1–13.
 62. Duering M, Karpinska A, Rosner S, Hopfner F, Zechmeister M, Peters N, et al. Co-aggregate formation of CADASIL-mutant NOTCH3: a single-particle analysis. *Hum Mol Genet.* 2011;20:3256–65.
 63. Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, et al. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest.* 2000;105:597–605.
 64. Ishiko A, Shimizu A, Nagata E, Takahashi K, Tabira T, Suzuki N. Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol.* 2006;112:333–9.
 65. Ueda A, Hirano T, Takahashi K, Kurisaki R, Hino H, Uyama E, et al. Detection of granular osmiophilic material of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy by light microscopy in frozen sections: Scientific correspondence. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009;35:618–22.
 66. Report S. Coexistence of CADASIL and Alzheimer’s disease. 2003;169:790–2.
 67. Malandrini A, Albani F, Palmeri S, Fattapposta F, Gambelli S, Berti G, et al. Asymptomatic cores and paracrystalline mitochondrial inclusions in CADASIL. *Neurology.* 2002;59:617–20.
 68. Lewandowska E, Dziewulska D, Parys M, Pasennik E. Ultrastructure of granular

- osmiophilic material deposits (GOM) in arterioles of CADASIL patients. *Folia Neuropathol.* 2011;49:174–80.
69. Oberstein SAJL, Maat-Schieman MLC, Boon EMJ, Haan J, Breuning MH, Duinen SG Van, et al. No vessel wall abnormalities in a human foetus with a NOTCH3 mutation [2]. *Acta Neuropathol.* 2008;115:369–70.
 70. Gravesteijn G, Munting LP, Overzier M, Mulder AA, Hegeman I, Derieppe M, et al. Progression and Classification of Granular Osmiophilic Material (GOM) Deposits in Functionally Characterized Human NOTCH3 Transgenic Mice. *Transl Stroke Res.* 2019.
 71. Capone C, Dabertrand F, Baron-Menguy C, Chalaris A, Ghezali L, Domenga-Denier V, et al. Mechanistic insights into a TIMP3-sensitive pathway constitutively engaged in the regulation of cerebral hemodynamics. *Elife.* 2016;5:1–26.
 72. Capone C, Cognat E, Ghezali L, Baron-Menguy C, Aubin D, Mesnard L, et al. Reducing Timp3 or vitronectin ameliorates disease manifestations in CADASIL mice. *Ann Neurol.* 2016;79:387–403.
 73. Nagatoshi A, Ueda M, Ueda A, Tasaki M, Inoue Y, Ma Y, Masuda T, Mizukami M, Matsumoto S, Kosaka T, Kawano T, Ito T AY. Serum amyloid P component: A novel potential player in vessel degeneration in CADASIL. *J Neurol Sci.* 2017;379:69–76.
 74. Jouvent E, Poupon C. Case Report Intracortical Infarcts in Small Vessel Disease A Combined 7-T Postmortem MRI and Neuropathological Case Study in Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts. 2011.
 75. Dichgans M, Holtmannspötter M, Herzog J, Peters N, Bergmann M, Yousry TA. Cerebral microbleeds in CADASIL: A gradient-echo magnetic resonance imaging and autopsy study. *Stroke.* 2002;33:67–71.
 76. Yamamoto Y, Ihara M, Tham C, Low RWC, Slade JY, Moss T, et al. Neuropathological correlates of temporal pole white matter hyperintensities in CADASIL. *Stroke.* 2009;40:2004–11.
 77. Cognat E, Cleophax S, Domenga-Denier V, Joutel A. Early white matter changes in CADASIL: Evidence of segmental intramyelinic oedema in a pre-clinical mouse model. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:1–16.
 78. Viswanathan A, Gray F, Bousser MG, Baudrimont M, Chabriat H. Cortical neuronal apoptosis in CADASIL. *Stroke.* 2006;37:2690–5.

79. Peters N, Opherk C, Zacherle S, Capell A, Gempel P, Dichgans M. CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp Cell Res.* 2004;299:454–64.
80. Karlström H, Beatus P, Dannaus K, Chapman G, Lendahl U, Lundkvist J, et al. A CADASIL-mutated Notch 3 receptor exhibits impaired intracellular trafficking and maturation but normal ligand-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:17119–24.
81. Haritunians T, Chow T, De Lange RPJJ, Nichols JT, Ghavimi D, Dorrani N, et al. Functional analysis of a recurrent missense mutation in Notch3 in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:1242–8.
82. Qualtieri A, Ungaro C, Bagalà A, Bianchi S, Pantoni L, Moccia M, et al. Notch3 protein expression in skin fibroblasts from CADASIL patients. *J Neurol Sci.* 2018;390:121–8.
83. Low WC, Santa Y, Takahashi K, Tabira T, Kalaria RN. CADASIL-causing mutations do not alter Notch3 receptor processing and activation. *Neuroreport.* 2006;17:945–9.
84. Grond J Van Der. Homozygosity for a NOTCH3 mutation in a 65 year old CADASIL patient with mild symptoms: A family report. 2008;255.
85. Tuominen S, Juvonen V, Amberla K, Jolma T, Rinne JO, Tuisku S, et al. Phenotype of a homozygous CADASIL patient in comparison to 9 age-matched heterozygous patients with the same R133C Notch3 mutation. *Stroke.* 2001;32:1767–74.
86. Monet M, Domenga V, Lemaire B, Souilhol C, Langa F, Babinet C, et al. The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Hum Mol Genet.* 2007;16:982–92.
87. Vion AC, Kheloufi M, Hammoutene A, Poisson J, Lasselin J, Devue C, et al. Autophagy is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E8675–84.
88. Hanemaaijer ES, Panahi M, Swaddiwudhipong N, Tikka S, Winblad B, Viitanen M, et al. Autophagy-lysosomal defect in human CADASIL vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol.* 2018;97:557–67.
89. Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T. Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. *Exp Neurol.*

- 2012;233:303–11.
90. Dzielulska D, Rafalowska J. Is the increased expression of ubiquitin in CADASIL syndrome a manifestation of aberrant endocytosis in the vascular smooth muscle cells? *J Clin Neurosci*. 2008;15:535–40.
 91. Neves KB, Harvey AP, Moreton F, Montezano AC, Rios FJ, Alves-Lopes R, et al. ER stress and Rho kinase activation underlie the vasculopathy of CADASIL. *JCI insight*. 2019.
 92. Fazlul Kabir M, Kim H-R, Chae H-J. Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. In: *Endoplasmic Reticulum*. IntechOpen; 2019.
 93. Viitanen M, Sundström E, Baumann M, Poyhonen M, Tikka S, Behbahani H. Experimental studies of mitochondrial function in CADASIL vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 2013;319:134–43.
 94. Lewandowska E, Wierzba-Bobrowicz T, Buczek J, Gromadzka G, Dzielulska D. CADASIL patient with extracellular calcium deposits. *Folia Neuropathol*. 2013;51:302–11.
 95. Dotti MT, Stefano N De, Bianchi S, Malandrini A, Battisti C, Cardaioli E, et al. A Novel NOTCH3 Frameshift Deletion and Mitochondrial Abnormalities in a Patient With CADASIL. 2004;61.
 96. De La Peña P, Bornstein B, Del Hoyo P, Fernández-Moreno MA, Martín MA, Campos Y, et al. Mitochondrial dysfunction associated with a mutation in the Notch3 gene in a CADASIL family. *Neurology*. 2001;57:1235–8.
 97. Annunen-Rasila J, Finnilä S, Mykkänen K, Moilanen JS, Veijola J, Pöyhönen M, et al. Mitochondrial DNA sequence variation and mutation rate in patients with CADASIL. *Neurogenetics*. 2006;7:185–94.
 98. Zellner A, Scharrer E, Arzberger T, Oka C, Domenga-Denier V, Joutel A, et al. CADASIL brain vessels show a HTRA1 loss-of-function profile. *Acta Neuropathol*. 2018;136:111–25.
 99. Singhal S, Markus HS. Cerebrovascular reactivity and dynamic autoregulation in nondemented patients with CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy). *J Neurol*. 2005;252:163–7.
 100. Peters N, Freilinger T, Opherck C, Pfefferkorn T, Dichgans M. Enhanced L-arginine-induced vasoreactivity suggests endothelial dysfunction in CADASIL. *J Neurol*. 2008;255:1203–8.
 101. Fujiwara Y, Mizuno T, Okuyama C, Nagakane Y, Watanabe-Hosomi A, Kondo

- M, et al. Simultaneous impairment of intracranial and peripheral artery vasoreactivity in CADASIL patients. *Cerebrovasc Dis.* 2012;33:128–34.
102. Campolo J, De Maria R, Frontali M, Taroni F, Inzitari D, Federico A, et al. Impaired vasoreactivity in mildly disabled CADASIL patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83:268–74.
103. de Boer I, Stam AH, Buntinx L, Zielman R, van der Steen I, van den Maagdenberg AMJM, et al. RVCL-S and CADASIL display distinct impaired vascular function. *Neurology.* 2018;91:e956–63.
104. Moreton FC, Cullen B, Delles C, Santosh C, Gonzalez RL, Dani K, et al. Vasoreactivity in CADASIL: Comparison to structural MRI and neuropsychology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38:1085–95.
105. Liem MK, Lesnik Oberstein SAJJ, Haan J, Boom RVDD, Ferrari MD, Buchem MAV V, et al. Cerebrovascular reactivity is a main determinant of white matter hyperintensity progression in CADASIL. *Am J Neuroradiol.* 2009;30:1244–7.
106. Chabriat H, Pappata S, Ostergaard L, Clark CA, Pachot-Clouard M, Vahedi K, et al. Cerebral hemodynamics in CADASIL before and after acetazolamide challenge assessed with MRI bolus tracking. *Stroke.* 2000;31:1904–12.
107. Tuominen S, Miao Q, Kurki T, Tuisku S, Pöyhönen M, Kalimo H, et al. Positron emission tomography examination of cerebral blood flow and glucose metabolism in young CADASIL patients. *Stroke.* 2004;35:1063–7.
108. Dubroca C, Lacombe P, Domenga V, Maciazek J, Levy B, Tournier-Lasserre E, et al. Impaired vascular mechanotransduction in a transgenic mouse model of CADASIL arteriopathy. *Stroke.* 2005;36:113–7.
109. Hussain MB, Singhal S, Markus HS, Singer DRJ. Abnormal Vasoconstrictor Responses to Angiotensin II and Noradrenaline in Isolated Small Arteries from Patients with Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL). *Stroke.* 2004;35:853–8.
110. Pfefferkorn T, Stuckrad-barre S Von, Herzog J, Gasser T, Hamann GF, Dichgans M. Reduced Cerebrovascular CO₂ Reactivity in CADASIL. A Transcranial Doppler Sonography Study. 2001;17–21.
111. Huneau C, Houot M, Joutel A, Béranger B, Giroux C, Benali H, et al. Altered dynamics of neurovascular coupling in CADASIL. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018;5(7):788–802.
112. Jokumsen-Cabral A, Aires A, Ferreira S, Azevedo E, Castro P. Primary

- involvement of neurovascular coupling in cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J Neurol*. 2019;266:1782–8.
113. Manganelli F, Ragno M, Cacchiò G, Iodice V, Trojano L, Silvaggio F, et al. Motor cortex cholinergic dysfunction in CADASIL: A transcranial magnetic demonstration. *Clin Neurophysiol*. 2008;119:351–5.
 114. Mesulam M, Siddique T, Cohen B. Cholinergic denervation in a pure multi-infarct state: Observations on CADASIL. *Neurology*. 2003;60:1183–5.
 115. Keverne JS, Low WCR, Ziabreva I, Court JA, Oakley AE, Kalaria RN. Cholinergic neuronal deficits in CADASIL. *Stroke*. 2007;38:188–91.
 116. Nardone R, Höller Y, Thomschewski A, Kunz AB, Lochner P, Golaszewski S, et al. Dopamine differently modulates central cholinergic circuits in patients with Alzheimer disease and CADASIL. *J Neural Transm*. 2014;121:1313–20.
 117. Vahedi K, Chabriat H, Levy C, Joutel A. Migraine With Aura and Brain Magnetic Resonance Imaging Abnormalities in Patients With CADASIL. 2015;61.
 118. Yan R, Tan Y, Markus HS. CADASIL : Migraine , Encephalopathy , Stroke and Their Inter-Relationships. 2016;1–14.
 119. Herve D, Guey S, Duering M, Godin O, Jouvent E, Opherk C, et al. Prevalence and characteristics of migraine in CADASIL. 2015;0:1–10.
 120. Launer LJ, Terwindt GM, Ferrari MD. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study. *Neurology [Internet]*. 1999;53:537–42.
 121. Adib-Samii P, Brice G, Martin RJ, Markus HS. Clinical spectrum of CADASIL and the effect of cardiovascular risk factors on phenotype: study in 200 consecutively recruited individuals. *Stroke*. 2010;41:630–4.
 122. Remes O, Lafortune L, Wainwright N, Surtees P, Khaw K-T, Brayne C. Association between area deprivation and major depressive disorder in British men and women: a cohort study. *BMJ Open*. 2019;9:e027530.
 123. Joon A, Park H, Jeon B, Lee JS, Newhouse PA, Taylor WD, et al. CADASIL as a Useful Medical Model and Genetic Form of Vascular Depression. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2017.
 124. Reyes S, Viswanathan A, Godin O, Dufouil C, Benisty S, Hernandez Z, et al. Apathy: A major symptom in Cadasil. *Neurology*. 2009;72:905–10.

125. Kumar SK MG. CADASIL Presenting as Bipolar Disorder. *Psychosomatics*. 1997;38:397–8.
126. Leyhe T, Wiendl H, Buchkremer G, Cadasil WH. Case report CADASIL : underdiagnosed in psychiatric patients ? 2005;392–6.
127. Harris JG, Filley CM. CADASIL: Neuropsychological findings in three generations of an affected family. *J Int Neuropsychol Soc*. 2001;7:768–74.
128. La PA. Schizophrenia in a patient with cerebral autosomally dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL disease). 2001;41–3.
129. Puy L, De Guio F, Godin O, Duering M, Dichgans M, Chabriat H, et al. Cerebral microbleeds and the risk of incident ischemic stroke in CADASIL (Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy). *Stroke*. 2017;48:2699–703.
130. Ling Y, De Guio F, Duering M, Jouvent E, Hervé D, Godin O, et al. Predictors and Clinical Impact of Incident Lacunes in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy. *Stroke*. 2017;48:283–9.
131. Jouvent E, Viswanathan A, Mangin J, Sullivan MO, Gschwendtner A, Cumurciuc R, et al. Brain Atrophy Is Related to Lacunar Lesions and Tissue Microstructural Changes in CADASIL. 2007.
132. Infarcts S. Multiple Simultaneous Cerebral Infarctions in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with. 2006;445–6.
133. Gordhan A, Hudson BK. Acute watershed infarcts with global cerebral hypoperfusion in symptomatic CADASIL. *J Radiol Case Rep*. 2013;7:8–15.
134. Taieb G, Renard D, Castelnovo G. Simultaneous subcortical infarcts as initial manifestation of CADASIL. *Acta Neurol Belg*. 2015;115:385–6.
135. Ando T, Goto Y, Mano K, Ueda A, Ando Y, Mizuta I, et al. CADASIL presenting as acute bilateral multiple subcortical infarcts without a characteristic temporal pole or any external capsule lesions. *Intern Med*. 2016;55:2873–6.
136. Au K, Appireddy R, Barber PA. Multifocal Cerebral and Bilateral Middle Cerebellar Peduncle Infarctions in CADASIL. *Can J Neurol Sci*. 2016;43:574–5.
137. Rubio A, Rifkin D, Powers JM, Patel U, Stewart J, Faust P, et al. Phenotypic variability of CADASIL and novel morphologic findings. 1997;247–54.
138. Choi JC, Kang S-YY, Kang J-HH, Park J-KK. Intracerebral hemorrhages in

- CADASIL. *Neurology*. 2006;67:2042–4.
139. Lian L, Li D, Xue Z, Liang Q, Xu F, Kang H, et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage in CADASIL. 2013;2–7.
 140. Pradotto L, Orsi L, Daniele D, Caroppo P, Lauro D, Milesi A, et al. A new NOTCH3 mutation presenting as primary intracerebral haemorrhage. *J Neurol Sci*. 2012;315:143–5.
 141. Jacob S, Rajabally YA. Spontaneous lobar haemorrhage in CADASIL. 2003;456–7.
 142. Mehta S, Mehndiratta P, Sila CA. Spontaneous cerebellar hemorrhage associated with a novel Notch3 mutation. *J Clin Neurosci*. 2013;20:1034–6.
 143. Koutroulou I, Karapanayiotides T, Grigoriadis N, Karacostas D. CADASIL presenting with spontaneous intracerebral hemorrhage: Report of a case and description of the first family in Northern Greece. *Hippokratia*. 2016;20:76–9.
 144. Zhang C, Li W, Li S, Niu S, Wang X, Tang H, et al. CADASIL: two new cases with intracerebral hemorrhage. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4:266–71.
 145. Chen CH, Tang SC, Cheng YW, Tsai HH, Chi NF, Sung PS, et al. Detrimental effects of intracerebral haemorrhage on patients with CADASIL harbouring NOTCH3 R544C mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90:841–3.
 146. Buffon F, Porcher R, Hernandez K, Kurtz A, Pointeau S, Vahedi K, et al. Cognitive profile in CADASIL. 2006;175–80.
 147. Charlton RA, Morris RG, Nitkunan A MH. The cognitive profiles of CADASIL and sporadic small vessel disease. *Neurology*. 2006;66:1523–6.
 148. Peters N, Opherck C, Danek A, Ballard C, Herzog J, Dichgans M. The pattern of cognitive performance in CADASIL: A monogenic condition leading to subcortical ischemic vascular dementia. *Am J Psychiatry*. 2005;162:2078–85.
 149. Chabriat H, Hervé D, Duering M, Godin O, Jouvent E, Opherck C, et al. Predictors of Clinical Worsening in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and. 2015;4–11.
 150. Grond J Van Der, Haan J, Liem MK, van der Grond J, Haan J, van den Boom R, et al. Lacunar infarcts are the main correlate with cognitive dysfunction in CADASIL. *Stroke*. 2007;38:923–8.
 151. Anand Viswanathan , Ophelia Godin , Eric Jouvent , Michael O’Sullivan A, cced Gschwendtner , Nils Peters , Marco Duering , Jean-Pierre Guichard M, e f, g h a Holtmannspötter , Carole Dufouil , Chahin Pachai , Marie-Germaine Bousser M,

- c a, Dichgans and HC. Impact of MRI markers in subcortical vascular dementia: A multi-modal analysis in CADASIL. *Neurobiol Aging*. 2009;30:890–897.
152. Jacqmin M, Hervé D, Viswanathan A, Guichard JP, During M, Dichgans M, et al. Confluent thalamic hyperintensities in CADASIL. *Cerebrovasc Dis*. 2010;30:308–13.
 153. Yao M, Hervé D, Jouvent E, Duering M, Reyes S, Godin O, et al. Dilated perivascular spaces in small-vessel disease: A study in CADASIL. *Cerebrovasc Dis*. 2014;37:155–63.
 154. Yin X, Zhou Y, Yan S, Lou M. Effects of Cerebral Blood Flow and White Matter Integrity on Cognition in CADASIL Patients. 2019;9:1–6.
 155. Sullivan MO, Barrick TR, Morris RG, Clark CA, Markus HS. Damage within a network of white matter regions underlies executive dysfunction in CADASIL. 2005.
 156. Nannucci S, Rinnoci V, Pracucci G, MacKinnon AD, Pescini F, Adib-Samii P, et al. Location, number and factors associated with cerebral microbleeds in an Italian-British cohort of CADASIL patients. *PLoS One*. 2018;13:1–12.
 157. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol*. 2013;12:822–38.
 158. Yousry TA, Seelos K, Mayer M, Brüning R, Uttner I, Dichgans M, et al. Characteristic MR lesion pattern and correlation of T1 and T2 lesion volume with neurologic and neuropsychological findings in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Am J Neuroradiol*. 1999;20:91–100.
 159. O’Sullivan M, Jarosz JM, Martin RJ, Deasy N, Powell JF, Markus HS. MRI hyperintensities of the temporal lobe and external capsule in patients with CADASIL. *Neurology*. 2001;56:628–34.
 160. Chawda SJ, De Lange RPJ, Hourihan MD, Halpin SFS, St. Clair D. Diagnosing CADASIL using MRI: Evidence from families with known mutations of Notch 3 gene. *Neuroradiology*. 2000;42:249–55.
 161. Coulthard A, Blank SC, Bushby K, Kalaria RN, Burn DJ. Distribution of cranial MRI abnormalities in patients with symptomatic and subclinical CADASIL. *Br J Radiol*. 2000;73:256–65.
 162. H. Chabriat; R. Mrissa; C. Levy; K. Vahedi; H. Taillia; M.T. Iba-Zizen; A. Joutel

- PET-LM-GB. Brain Stem MRI Signal Abnormalities in CADASIL. *Stroke*. 1999;30:457–9.
163. Chabriat H, Levy C, Taillia H, Iba-Zizen MT, Vahedi K, Joutel A, et al. Patterns of MRI lesions in CADASIL. *Neurology*. 1998;51:452–7.
 164. Wiaaard R, Bornebroek M, Ophoff RA, Winter-Warnars HAO, Scheltens P, Frants RR, et al. A four-generation Dutch family with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), linked to chromosome 19p13. *Clin Neurol Neurosurg*. 1995;97:307–13.
 165. Opherk C, Peters N, Holtmannspötter M, Gschwendtner A, Müller-Myhsok B, Dichgans M. Heritability of MRI lesion volume in CADASIL: Evidence for genetic modifiers. *Stroke*. 2006;37:2684–9.
 166. Gesierich B, Opherk C, Rosand J, Gonik M, Malik R, Jouvent E, et al. APOE ϵ 2 is associated with white matter hyperintensity volume in CADASIL. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36:199–203.
 167. Cumurciuc R, Guichard J-PP, Reizine D, Gray F, Bousser MG, Chabriat H. Dilation of Virchow-Robin spaces in CADASIL. *Eur J Neurol*. 2006;13:187–90.
 168. De Guio F, Vignaud A, Chabriat H, Jouvent E. Different types of white matter hyperintensities in CADASIL: Insights from 7-Tesla MRI. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38:1654–63.
 169. Viswanathan A, Guichard J-P, Gschwendtner A, Buffon F, Cumurciuc R, Boutron C, et al. Blood pressure and haemoglobin A1c are associated with microhaemorrhage in CADASIL: a two-centre cohort study. *Brain*. 2006;129:2375–83.
 170. Liem MK, Oberstein SAJL, Versluis MJ, Maat-Schieman MLC, Haan J, Webb AG, et al. 7 T MRI reveals diffuse iron deposition in putamen and caudate nucleus in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:1180–5.
 171. Pescini F, Nannucci S, Bertaccini B, Salvadori E, Bianchi S, Ragno M, et al. The Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) Scale: a screening tool to select patients for NOTCH3 gene analysis. *Stroke*. 2012;43:2871–6.
 172. Ebke M, Dichgans M, Bergmann M, Voelter HU, Rieger P, Gasser T, et al. CADASIL: Skin biopsy allows diagnosis in early stages. *Acta Neurol Scand*. 1997;95:351–7.

173. Furby A, Vahedi K, Force M, Larrouy S, Ruchoux MM, Joutel A, et al. Differential diagnosis of a vascular leukoencephalopathy within a CADASIL family: Use of skin biopsy electron microscopy study and direct genotypic screening. *J Neurol*. 1998;245:734–40.
174. Mayer M, Straube A, Bruening R, Uttner I, Pongratz D, Gasser T, et al. Muscle and skin biopsies are a sensitive diagnostic tool in the diagnosis of CADASIL. *J Neurol*. 1999;246:526–32.
175. Rumbaugh JA, LaDuca JR, Shan Y, Miller CA. CADASIL: The dermatologic diagnosis of a neurologic disease. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43:1128–30.
176. Tikka S, Mykknen K, Ruchoux M-MM, Bergholm R, Junna M, Pyhnen M, et al. Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain*. 2009;132:933–9.
177. Joutel A, Favrole P, Labauge P, Chabriat H, Lescoat C, Andreux F, et al. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet*. 2001;358:2049–51.
178. Lesnik Oberstein SAJ, van Duinen SG, van den Boom R, Maat-Schieman MLC, van Buchem MA, van Houwelingen HC, et al. Evaluation of diagnostic NOTCH3 immunostaining in CADASIL. *Acta Neuropathol*. 2003;106:107–11.
179. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssière C, et al. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet*. 1997;350:1511–5.
180. Oberstein SAJL, S.S.M. Razvi, MD, MRCP, R. Davidson, FRCP, I. Bone, FRCP, K.W. Muir, MD F. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology*. 2003;60:4–5.
181. Dotti MT, Federico A, Mazzei R, Bianchi S, Scali O, Conforti FL, et al. The spectrum of Notch3 mutations in 28 Italian CADASIL families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:736–8.
182. Bianchi S, Rufa A, Ragno M, D'Eramo C, Pescini F, Pantoni L, et al. High frequency of exon 10 mutations in the NOTCH3 gene in Italian CADASIL families: Phenotypic peculiarities. *J Neurol*. 2010;257:1039–42.
183. Mosca L, Marazzi R, Ciccone A, Santilli I, Bersano A, Sansone V, et al. NOTCH3 gene mutations in subjects clinically suspected of CADASIL. *J Neuro Sci*. 2011;307:144–8.
184. Testi S, Malerba G, Ferrarini M, Ragno M, Pradotto L, Mauro A, et al. Mutational and haplotype map of NOTCH3 in a cohort of Italian patients with

- cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *J Neurol Sci.* 2012;319:37–41.
185. Cocho D, Martí-Fàbregas J, Baiget M, Gallardo E, Rio E, Arboix A, et al. Diagnóstico de la enfermedad de CADASIL en pacientes normotensos y no diabéticos con infarto lacunar. *Neurología.* 2011;26:325–30.
 186. Fernández A, Gómez J, Alonso B, Iglesias S, Coto E. A Next-Generation Sequencing of the NOTCH3 and HTRA1 Genes in CADASIL Patients. *J Mol Neurosci.* 2015;56:613–6.
 187. Mykkänen K, Junna M, Amberla K, Bronge L, Kääriäinen H, Pöyhönen M, et al. Different clinical phenotypes in monozygotic cadasil twins with a novel notch3 mutation. *Stroke.* 2009;40:2215–8.
 188. Ceroni M, Poloni TE, Tonietti S, Fabozzi D, Uggetti C, Frediani F, et al. Migraine with aura and white matter abnormalities : Notch3 mutation. 2000;1869–72.
 189. Pescini F, Bianchi S, Salvadori E, Poggesi A, Teresa M, Federico A, et al. Short communication A pathogenic mutation on exon 21 of the NOTCH3 gene causing CADASIL in an octogenarian paucisymptomatic patient. 2008;267:170–3.
 190. Watanabe M, Adachi Y, Jackson M, Yamamoto-watanabe Y, Wakasaya Y, Shirahama I, et al. An Unusual Case of Elderly-Onset Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) With Multiple Cerebrovascular Risk Factors. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2012;21:143–5.
 191. Monet-Lepretre M, Bardot B, Lemaire B, Domenga V, Godin O, Dichgans M, et al. Distinct phenotypic and functional features of CADASIL mutations in the Notch3 ligand binding domain. *Brain.* 2009;132(6):1601–12.
 192. Gravesteijn G, Rutten JW, Verberk IMW, Böhringer S, Liem MK, van der Grond J, et al. Serum Neurofilament light correlates with CADASIL disease severity and survival. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(1):46–56.
 193. Khan MT, Murray A, Smith M. Successful Use of Intravenous Tissue Plasminogen Activator as Treatment for a Patient with Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy: A Case Report and Review of Literature. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016 Apr 1;25(4):e53–7.
 194. Martikainen MH, Roine S. Rapid improvement of a complex migrainous episode

- with sodium valproate in a patient with CADASIL. 2011;1–3.
195. Weller M, Dichgans J, Klockgether T. Acetazolamide-responsive migraine in CADASIL. *Neurology*. 1998;50(5):1505.
 196. Forteza AM, Brozman B, Rabinstein AA, Romano JG, Bradley WG. Acetazolamide for the treatment of migraine with aura in CADASIL. *Neurology*. 2001;57:2144–5.
 197. Donnini I, Nannucci S, Valenti R, Pescini F, Bianchi S, Inzitari D, et al. Acetazolamide for the prophylaxis of migraine in CADASIL: a preliminary experience. *J Headache Pain*. 2012;13:299–302.
 198. Goldstein ED, Badi MK, Meschia JF. Treating chronic migraine in CADASIL with calcitonin gene-related peptide receptor antagonism. *Neurol Clin Pract*. 2019;9:277–8.
 199. Peters N, Freilinger T, Opherk C, Pfefferkorn T, Dichgans M. Effects of short term atorvastatin treatment on cerebral hemodynamics in CADASIL. *J Neurol Sci*. 2007;260:100–5.
 200. Dichgans M, Markus HS, Salloway S, Verkkoniemi A, Moline M, Wang Q, et al. Donepezil in patients with subcortical vascular cognitive impairment: a randomised double-blind trial in CADASIL. *Lancet Neurol*. 2008;7:310–8.
 201. Schneider LS. Does donepezil improve executive function in patients with CADASIL? *Lancet Neurol*. 2008;7:287–9.
 202. Posada JJ, Ferrero M, López-Valdés E, Goñi-Imízcoz M. Tratamiento con galantamina en la demencia asociada a CADASIL. *Rev Neurol*. 2008;47:299–300.
 203. Mizuno T, Kondo M, Ishigami N, Tamura A, Itsukage M, Koizumi H, et al. Cognitive impairment and cerebral hypoperfusion in a CADASIL patient improved during administration of lomerizine. *Clin Neuropharmacol*. 2009;32:113–6.
 204. Liu XY, Gonzalez-Toledo ME, Fagan A, Duan WM, Liu Y, Zhang S, et al. Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor exhibit therapeutic effects in a mouse model of CADASIL. *Neurobiol Dis*. 2015;73:189–203.
 205. De Maria R, Campolo J, Frontali M, Taroni F, Federico A, Inzitari D, et al. Effects of sapropterin on endothelium-dependent vasodilation in patients with CADASIL: A randomized controlled trial. *Stroke*. 2014;45:2959–66.
 206. Formichi P, Radi E, Battisti C, Di Maio G, Dotti MT, Muresanu D, et al. Effects

- of cerebrolysin administration on oxidative stress-induced apoptosis in lymphocytes from CADASIL patients. *Neurol Sci.* 2013;34:553–6.
207. Ghezali L, Capone C, Baron-Menguy C, Ratelade J, Christensen S, Østergaard Pedersen L, et al. Notch3ECD immunotherapy improves cerebrovascular responses in CADASIL mice. *Ann Neurol.* 2018;84:246–59.
208. Rutten JW, Dauwerse HG, Peters DJM, Goldfarb A, Venselaar H, Haffner C, et al. Therapeutic NOTCH3 cysteine correction in CADASIL using exon skipping: In vitro proof of concept. *Brain.* 2016;139:1123–35.
209. Mazzei R, Conforti FL, Lanza PL, Sprovieri T, Lupo MR, Gallo O, et al. A novel Notch3 gene mutation not involving a cysteine residue in an Italian family with CADASIL. *Neurology.* 2004;63:561–4.
210. Arboleda-Velasquez JF, Manent J, Lee JH, Tikka S, Ospina C, Vanderburg CR, et al. Hypomorphic Notch 3 alleles link Notch signaling to ischemic cerebral small-vessel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:E128-35.
211. Rutten JW, Haan J, Terwindt GM, Duinen SG Van. Interpretation of NOTCH3 mutations in the diagnosis of CADASIL. 2014;593–603.
212. Fernandez-Cadenas I, Andreu AL, Gamez J, Gonzalo R, Martín MA, Rubio JC, et al. Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease. *Neurology.* 2003;61:1432–4.
213. Pena-Casanova J, Quinones-Ubeda S, Gramunt-Fombuena N, Quintana M, Aguilar M, Molinuevo JL, Serradell M, Robles A, Barquero MS, Payno M, Antunez C, Martinez-Parra C, Frank-Garcia A, Fernandez M, Alfonso V, Sol JM BR. Spanish multicenter normative studies (neuronorma project): Norms for the stroop color-word interference test and the tower of london-drexel. *Arch Clin Neuropsychol Off J Natl Acad Neuropsychol.* 2009;24:413–29.
214. Pena-Casanova J, Quinones-Ubeda S, Gramunt-Fombuena N, Quintana-Aparicio M, Aguilar M, Badenes D, Cerulla N, Molinuevo JL, Ruiz E, Robles A, Barquero MS, Antunez C, Martinez-Parra C, Frank-Garcia A, Fernandez M, Alfonso V, Sol JM BR. Spanish multicenter normative studies (neuronorma project): Norms for verbal fluency tests. *Arch Clin Neuropsychol Off J Natl Acad Neuropsychol.* 2009;24:395–411.
215. Pena-Casanova J, Quinones-Ubeda S, Quintana-Aparicio M, Aguilar M, Badenes D, Molinuevo JL, Torner L, Robles A, Barquero MS, Villanueva C, Antunez C, Martinez-Parra C, Frank-Garcia A, Sanz A, Fernandez M, Alfonso V, Sol JM

- BR. Spanish multicenter normative studies (neuronorma project): Norms for verbal span, visuospatial span, letter and number sequencing, trail making test, and symbol digit modalities test. *Arch Clin Neuropsychol Off J Natl Acad Neuropsychol*. 2009;24:321–41.
216. Yu Z, Liu J, Guo S, Xing C, Fan X, Ning M, et al. Neuroglobin-overexpression alters hypoxic response gene expression in primary neuron culture following oxygen glucose deprivation. *Neuroscience*. 2009;162:396–403.
 217. Ye J, Das S, Roy A, Wei W, Huang H, Lorenz-Guertin JM, et al. Ischemic Injury-Induced CaMKII δ and CaMKII γ Confer Neuroprotection Through the NF- κ B Signaling Pathway. *Mol Neurobiol*. 2019;56:2123–36.
 218. Iyirhiaro GO, Zhang Y, Estey C, O'Hare MJ, Safarpour F, Parsanejad M, et al. Regulation of ischemic neuronal death by E2F4-p130 protein complexes. *J Biol Chem*. 2014;289:18202–13.
 219. Huang T, González YR, Qu D, Huang E, Safarpour F, Wang E, et al. The pro-death role of Cited2 in stroke is regulated by E2F1/4 transcription factors. *J Biol Chem*. 2019;294:8617–29.
 220. Fernandez-Cadenas I, Del A, Mendioroz M, Fernandez- J, Penalba A, Rubiera M, et al. Genes involved in hemorrhagic transformations that follow recombinant t - PA treatment in stroke patients R esearch A rticle. 2013;14:495–504.
 221. García-Berrocoso T, Palà E, Consegal M, Piccardi B, Negro A, Gill N, et al. Cardioembolic Ischemic Stroke Gene Expression Fingerprint in Blood: a Systematic Review and Verification Analysis. *Transl Stroke Res*. 2019.
 222. Relative Quantitation Using Comparative CT Getting Started Guide. Applied Biosystems.
 223. Applied Biosystems. Relative Quantitation Analysis Module. User Guide. 2016; Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014820_RelativeQuant_UG.pdf
 224. Hochberg YB and Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57:289–300.
 225. Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol*. 2005;5.
 226. Roquer J, Rodríguez-Campello A, Jiménez-Conde J, Cuadrado-Godia E, Giralt-Steinhauer E, Vivanco Hidalgo RM, et al. Sex-related differences in primary

- intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2016;87:257–62.
227. Khan MT, Murray A, Smith M. Successful Use of Intravenous Tissue Plasminogen Activator as Treatment for a Patient with Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy: A Case Report and Review of Literature. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016;25:e53–7.
228. Ntaios G, Faouzi M, Ferrari, J Lang W, Vemmos K, Michel P. An integer-based score to predict functional outcome in acute ischemic stroke: the ASTRAL score. *Neurology*. 2012;78:1916–22.
229. McPherson WC and JC and JA and YX and J. shiny: Web Application Framework for R. 2016.
230. de Ridder IR, Dijkland SA, Scheele M, den Hertog HM, Dirks M, Westendorp WF, et al. Development and validation of the Dutch Stroke Score for predicting disability and functional outcome after ischemic stroke: A tool to support efficient discharge planning. *Eur stroke J*. 2018;3:165–73.
231. Bursac Z, Gauss CH, Williams DK, Hosmer DW. Purposeful selection of variables in logistic regression. *Source Code Biol Med*. 2008;3:1–8.
232. Bennett DA. How can I deal with missing data in my study? *Aust N Z J Public Health*. 2001;25:464–9.
233. Ripley WNV and BD. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth. Springer; 2002.
234. Steenbergen BS and M. brant: Test for Parallel Regression Assumption. 2018.
235. Sim J, Teece L, Dennis MS, Roffe C, SO₃S Study Team SS. Validation and Recalibration of Two Multivariable Prognostic Models for Survival and Independence in Acute Stroke. *PLoS One*. 2016;11:e0153527.
236. Jay M. generalhoslem: Goodness of Fit Tests for Logistic Regression Models. 2018.
237. Team RC. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2017.
238. Frosch MP. A 46-Year-Old Man with Migraine , Aphasia , and Hemiparesis and Similarly Affected Family Members. *N Engl J Med*. 2009;360:1656–65.
239. Mizuno T, Muranishi M, Torugun T, Tango H, Nagakane Y, Kudeken T, et al. Two Japanese CADASIL Families Exhibiting Notch3 Mutation R75P Not Involving Cysteine Residue. *Intern Med*. 2008;47:2067–72.
240. Wollenweber FA, Hanecker P, Bayer-karpinska A, Malik R, Bätzner H, Moreton F, et al. Cysteine-sparing CADASIL mutations in NOTCH3 show proaggregatory properties in vitro. *Stroke*. 2015;46:786–92.

241. Ge W, Kuang H, Wei B, Bo L, Xu Z, Xu X, et al. A novel cysteine-sparing NOTCH3 mutation in a Chinese family with CADASIL. *PLoS One*. 2014;9:e104533.
242. Santa Y, Uyama E, Chui DH, Arima M, Kotorii S, Takahashi K, et al. Genetic, clinical and pathological studies of CADASIL in Japan: a partial contribution of Notch3 mutations and implications of smooth muscle cell degeneration for the pathogenesis. *J Neurol Sci*. 2003;212:79–84.
243. Fouillade C, Chabriat H, Riant F, Mine M, Arnoud M, Magy L, et al. Activating NOTCH3 mutation in a patient with small-vessel-disease of the brain. *Hum Mutat*. 2008;29:452.
244. Bersano A, Dotti MT, Candelise L. Considerations on a mutation in the NOTCH3 gene sparing a cysteine residue: a rare polymorphism rather than a CADASIL variant. *Funct Neurol*. 2012;27:247–52.
245. Ungaro C, Mazzei R, Conforti FL, Sprovieri T, Servillo P, Liguori M, et al. Cadasil: Extended polymorphisms and mutational analysis of the NOTCH3 gene. *J Neurosci Res*. 2009;87:1162–7.
246. Ampuero I, Alegre-Abarrategui J, Rodal I, España A, Ros R, Sendón JLL, et al. On the diagnosis of CADASIL. *J Alzheimers Dis*. 2009;17:787–94.
247. Roy B, Maksemous N, Smith R a, Menon S, Davies G, Griffiths LR. Two novel mutations and a previously unreported intronic polymorphism in the NOTCH3 gene. *Mutat Res*. 2012;732:3–8.
248. Abramychева N, Stepanova M, Kalashnikova L, Zakhárova M, Maximova M, Tanashyan M, et al. New mutations in the Notch3 gene in patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL). *J Neurol Sci*. 2015;349:196–201.
249. Scheid R. Cysteine-sparing NOTCH3 mutations: CADASIL or CADASIL variants? *Neurology*. 2008;71:774–7.
250. Kim Y, Choi EJ, Choi CG, Kim G, Choi JH, Yoo HW, et al. Characteristics of CADASIL in Korea: A novel cysteine-sparing Notch3 mutation. *Neurology*. 2006;66:1511–6.
251. Wang Z, Yuan Y, Zhang W, Lv H, Hong D, Chen B, et al. NOTCH3 mutations and clinical features in 33 mainland Chinese families with CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82:534–9.
252. M. Uchino, T. Hirano, E. Uyama YH. Cerebral Autosomal Dominant

- Arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) and CADASIL-like disorders in Japan.
253. Ueda A, Ueda M, Nagatoshi A, Hirano T, Ito T, Arai N, et al. Genotypic and phenotypic spectrum of CADASIL in Japan: the experience at a referral center in Kumamoto University from 1997 to 2014. *J Neurol*. 2015;262:1828–36.
 254. Santiveri CM, Santoro J, Rico M, Jiménez MA. Factors involved in the stability of isolated β -sheets: Turn sequence, β -sheet twisting, and hydrophobic surface burial. *Protein Sci*. 2004;13:1134–47.
 255. Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massagué J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell*. 2002;110:19–32.
 256. Yamamoto Y, Ihara M. Disruption of transforming growth factor- β superfamily signaling : A shared mechanism underlying hereditary cerebral small vessel disease. *Neurochem Int*. 2016;5–7.
 257. Müller K, Courtois G, Ursini MV, Schwaninger M. New Insight into the Pathogenesis of Cerebral Small-Vessel Diseases. *Stroke*. 2017;48:520–7.
 258. Zellner A, Scharrer E, Arzberger T, Oka C, Domenga V, Joutel A, et al. CADASIL brain vessels show a HTRA1 loss - of - function profile. *Acta Neuropathol*. 2018.
 259. Opherk C, Gonik M, Duering M, Malik R, Jouvent E, Hervé D, et al. Genome-wide genotyping demonstrates a polygenic risk score associated with white matter hyperintensity volume in CADASIL. *Stroke*. 2014;45:968–72.
 260. He L, Xu R, Wang J, Zhang L, Zhang L, Zhou F, et al. Capsular warning syndrome: Clinical analysis and treatment. *BMC Neurol*. 2019;19:1–7.
 261. Battaglia A, Scalisi A, Donzelli A. The systematic review of randomized controlled trials of PCSK9 antibodies challenges their “efficacy breakthrough” and the “lower, the better” theory. *Curr Med Res Opin*. 2018;34:1725–30.
 262. Yaghi S, Elkind MSV. Lipid Control and Beyond: Current and Future Indications for Statin Therapy in Stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2016;18:1–15.
 263. Sim J, Teece L, Dennis MS, Roffe C, SO \square S Study Team SS, Dennis MS, et al. Validation and recalibration of two multivariable prognostic models for survival and independence in acute stroke. *PLoS One*. 2016;11:1–17.
 264. Wang W-YY, Sang W-WW, Jin D, Yan S-MM, Hong Y, Zhang H, et al. The Prognostic Value of the iScore, the PLAN Score, and the ASTRAL Score in Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26:4–9.

ANEXOS



Review

Systematic Review of Cysteine-Sparing *NOTCH3* Missense Mutations in Patients with Clinical Suspicion of CADASIL

Elena Muino¹, Cristina Gallego-Fabrega¹, Natalia Cullell¹, Caty Carrera², Nuria Torres¹, Jurek Krupinski³, Jaume Roquer⁴, Joan Montaner² and Israel Fernandez-Cadenas^{1,*}

- ¹ Stroke Pharmacogenomics and Genetics, Fundació Docència i Recerca Mútua Terrassa, Hospital Mútua de Terrassa, 08221 Terrassa, Spain; elena.muinho@gmail.com (E.M.); cristina.gallego.fabrega@gmail.com (C.G.-F.); natalia.cullell@gmail.com (N.C.); n.torres.ag@gmail.com (N.T.)
 - ² Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research, Hospital Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain; catycarrerav@gmail.com (C.C.); joan.montaner@vhir.org (J.M.)
 - ³ Neurology Service, Hospital Mútua de Terrassa, 08221 Terrassa, Spain; jkrupinski@mutuaterrassa.es
 - ⁴ Neurology Service, Institut Hospital del Mar d'investigacions Mèdiques, IMIM-Hospital del Mar, 08003 Barcelona, Spain; JRoquer@parcdesalutmar.cat
- * Correspondence: israelcadenas@yahoo.es; Tel.: +34-937-36-50-50 (ext. 11803)

Received: 27 July 2017; Accepted: 10 September 2017; Published: 13 September 2017

Abstract: CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) is caused by mutations in the *NOTCH3* gene, affecting the number of cysteines in the extracellular domain of the receptor, causing protein misfolding and receptor aggregation. The pathogenic role of cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations in patients with typical clinical CADASIL syndrome is unknown. The aim of this article is to describe these mutations to clarify if any could be potentially pathogenic. Articles on cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations in patients with clinical suspicion of CADASIL were reviewed. Mutations were considered potentially pathogenic if patients had: (a) typical clinical CADASIL syndrome; (b) diffuse white matter hyperintensities; (c) the 33 *NOTCH3* exons analyzed; (d) mutations that were not polymorphisms; and (e) Granular osmiophilic material (GOM) deposits in the skin biopsy. Twenty-five different mutations were listed. Four fulfill the above criteria: p.R61W; p.R75P; p.D80G; and p.R213K. Patients carrying these mutations had typical clinical CADASIL syndrome and diffuse white matter hyperintensities, mostly without anterior temporal pole involvement. Cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations are associated with typical clinical CADASIL syndrome and typical magnetic resonance imaging (MRI) findings, although with less involvement of the anterior temporal lobe. Hence, these mutations should be further studied to confirm their pathological role in CADASIL.

Keywords: CADASIL; cysteine; *NOTCH3*; mutation; temporal pole

1. Introduction

CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) is an inherited systemic arterial vessel disease caused by mutations in the *NOTCH3* gene, located on the 19p13 chromosome [1,2], which encodes a transmembrane receptor that is mainly expressed in the smooth muscle cells of blood vessels and pericytes [3].

This receptor has three domains: (1) a large extracellular domain (ECD) with 34 epidermal growth factor (EGF)-like repeats encoded by exons 2–24, where *NOTCH3* mutations are typically located; (2) a transmembrane domain; and (3) an intracellular domain (ICD). Each EGF-like repeat contains six cysteines that form three disulfide bonds, which contribute significantly to the protein's tertiary structure.

Pathogenic mutations in CADASIL are dominant; the presence of only one mutation in one of both alleles is the cause of the pathology. The pathogenic mutations are associated with changes in the number of cysteines, these changes cause an odd number of cysteines, leading to a misfolding of the receptor, enhanced formation of oligomers and ECD aggregation, facilitated by crosslinking of sulfhydryl groups [4–6]. This ECD aggregation is considered to be the main pathogenic mechanism of the disease. In terms of NOTCH3 activity, classic mutations have been described with normal or decreased NOTCH3 activity. Nevertheless, its role in the pathogenic mechanism is controversial, and several authors have shown that altered NOTCH3 function is not the primary determinant of the disease [7–9].

The main symptoms of CADASIL are migraine, psychiatric disorders, recurrent small subcortical infarctions, and dementia [10]. The average age at stroke onset is approximately 46 years, although recent studies have described an older onset, at 52 years for males and 57 for females [11]; for dementia, the average age at onset is 55 [12].

Magnetic resonance imaging (MRI) and histopathology show small subcortical infarctions and confluent white matter hyperintensities (WMH), mostly in periventricular locations and with additional involvement of the anterior temporal pole and the external capsule [13].

It has been described elsewhere that WMH in the temporal pole have 89–95% sensitivity and 80–86% specificity for CADASIL diagnosis in Caucasian patients [14], and up to 95% of these patients have this alteration [15]. Nevertheless, in Asian populations the prevalence of temporal pole involvement is only between 44.8–71% [16].

Additionally, it is typical to find granular osmiophilic material (GOM), consisting of parts of the extracellular domain of NOTCH3 [17], in the extracellular space and located close to the cell surface in smooth-muscle cells [18]. The presence of GOM has 45–96% sensitivity and 100% specificity for CADASIL diagnosis [15,19], but the pathological role of GOM is still debated.

Recent studies have found that mutations that do not affect the number of cysteines (unlike the typical mutations) seem to be associated with clinical CADASIL syndrome. However, the pathogenic role of these mutations is uncertain.

Therefore, this is a systematic review of those studies in which patients with a clinical suspicion of CADASIL and cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations have been described. The aims of this article are to: (1) find data in the literature and in databases relating to cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations observed in patients with typical clinical CADASIL syndrome; (2) describe the epidemiological characteristics of these patients; (3) determine whether these mutations could be considered potentially pathogenic.

There is not a consensus to determine whether a mutation can be considered pathogenic. Depending on the disease the presence of a missense mutation that has not been described previously in healthy subjects and with bioinformatic data supporting the pathogenicity is enough to consider a mutation the cause of the disease [20]. However this is not the case for other diseases and more analysis should be performed. For instance in neurodegenerative disorders there are studies that have analyzed the conservation of the residue during the evolution or have analyzed the presence of described mutations involving the same Wild-type amino acid [21,22].

In the case of CADASIL, the presence of GOM is very important because this finding indicates that the patient has CADASIL. The other critical point is to analyze all the exons of the *NOTCH3* gene to find the mutation that causes the pathology. In our systematic review we have considered these two analyzes among others to identify a pathogenic mutation.

2. Results

Of the 244 studies reviewed, 16 fulfilled the inclusion/exclusion criteria and 34 index cases were described, with 25 different mutations. Twelve out of the 18 patients were female (67%) and six were male (33%); 17 of the total number of patients were European (50%), 14 were Asian (41%), two patients were from Oceania and one was North-American (Table 1).

Table 1. Mutations found that do not affect cysteine amino acids.

Number	Mutation	Replaced	Substitution	Exon	Sequencing	MAF (ExAC)	MAF (1000 G)
1	p.R61W	Arg	Trp	2	33 exons	0.00007471	-
2	p.R75P	Arg	Pro	3	Exon: 3, 4, 11, 18; intron	0	0
3	p.R75P	Arg	Pro	3	Exon: 3, 4, 11, 18; intron	0	0
4	p.R75P	Arg	Pro	3	Exon: 3, 4, 11, 18; intron	0	0
5	p.R75P	Arg	Pro	3	33 exons, promotor	0	0
6	p.R75P	Arg	Pro	3	33 exons, promotor	0	0
7	p.R75P	Arg	Pro	3	Exon: 2-24	0	0
8	p.D80G	Asp	Gly	3	33 exons	0	0
9	p.R107W	Arg	Trp	3	Exon: 2-23	0.00001750	-
10	p.G149V	Gly	Val	4	33 exons, intron	0	0
11	p.Q151E	Gln	Glu	4	Exon: 2-23	0.00005703	-
12	p.Q151E	Gln	Glu	4	Exon: 2-6, 8, 11, 14, 18, 19, 22, 23; intron	0.00005703	-
13	p.H170R	His	Arg	4	Exon: 2-6, 8, 11, 14, 18, 19, 22, 23; intron	0.001917	0.001
14	p.H170R	His	Arg	4	Exon: 2, 3, 4, 11, 18, 19	0.001917	0.001
15	p.A198T	Ala	Thr	4	Exon: 2-23	0.00002513	-
16	p.A202V	Ala	Val	4	Exon: 2, 3, 4, 11, 18, 19	0.00001672	-
17	p.R207H	Arg	His	4	Exon: 2-23	0.00001664	0.000
18	p.R213K	Arg	Lys	4	-	0	0
19	p.R213K	Arg	Lys	4	33 exons	0	0
20	p.V237M	Val	Met	5	-	0.0002239	0.000
21	p.V252M	Val	Met	5	Exon: 2-23; intron	0.00002493	-
22	p.E309K	Glu	Lys	6	Exon: 2-23	0	0
23	p.S497L	Ser	Leu	9	Exon: 2-23; intron	0.01234	0.007
24	p.T577A	Thr	Ala	11	-	0.00001669	0
25	p.R592S	Arg	Ser	11	Exon: 2-23	0.00006714	-
26	p.V644D	Val	Asp	12	Exon: 2-23	0.0007013	0.000
27	p.S978R	Ser	Arg	18	-	0.0004606	0.000
28	p.A1020P	Ala	Pro	19	-	0.07318	0.110
29	p.A1020P	Ala	Pro	19	-	0.07318	0.110
30	p.T1098S	Thr	Ser	20	Exon: 2-24	0	0
31	p.H1133Q	His	Gln	21	Exon: 2-23, intron	0.01022	0.003
32	p.H1235L	His	Leu	22	Exon: 2-23	0.003990	0.001
33	p.L1515P	Leu	Pro	25	33 exons, intron	0	0
34	p.V1762M	Val	Met	29	33 exons	0.0002146	-

This table shows the main genetic features of the 34 index patients: mutation, amino acid replaced, amino acid substituent, exon where mutation is located, exons sequenced, minor allele frequency (MAF) according to Exome Aggregation Consortium (ExAC), MAF according to 1000 Genomes Project, author and reference.

2.1. Mutation Features

Twenty-five different cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations were identified from the 34 patients described in the 18 papers analyzed (Table 1). A complete evaluation of the *NOTCH3* exons was carried out in 29% (8 out of 28) of the patients; therefore, in the other cases it was not possible to rule out mutations involving cysteine residues. The mutations with the 33 exons analyzed were: p.R61W [23]; p.R75P [25]; p.D80G [27]; p.G149V [29]; p.R213K [33]; p.L1515P [37]; and p.V1762M [38] (Table 1).

Amino acid changes involving arginine were present in 44% of the patients, while those involving proline were present in 26%. Only two mutations were found in exons that do not encode for the ECD: p.L1515P [37] and p.V1762M [38], which encoded for the ICD.

The search for all mutations in Exome Aggregation Consortium (ExAC) and the 1000 Genomes Project showed that only p.H1235L [28], p.H170R [30,31], p.S497L [34], p.A1020P [36], and p.H1133Q [34] were polymorphisms or subpolymorphic variants, as their MAF was >0.1%.

2.2. Clinical Features

Of the 34 probands described in the 18 articles, 33% presented cardiovascular risk factors such as smoking, hypertension, and/or dyslipidemia. Clinical symptoms included migraine (93%), stroke (100%), seizures (60%), psychiatric disturbances (100%), pseudobulbar palsy (80%), and dementia (94%), and gait disturbance was specified in four cases. A family history of stroke and/or dementia was observed in 96% of the probands (Table 2).

The neuroimaging data revealed that all probands had severe WMH, although 91% did not have anterior temporal pole involvement.

GOM deposits were found in six out of nine probands (67%). In two of these cases, they were also found in the proband's siblings. Specifically, mutations with GOM were: p.R61W [23] in the symptomatic proband's siblings, who had the same mutation; p.R75P [24–26]; p.D80G [30] in the symptomatic proband's siblings, who had the same mutation; p.R213K [33], p.A1020P [36] (in one of the two probands); and p.T1098S [26]. However, three out of nine probands had cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations not associated with GOM: p.A1020P [33] (in one of two probands), p.L1515P [34] and p.V1762M [35]; the latter two were mutations located in the ICD.

A summary of the main characteristics of cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations is given in Table 3.

The table not only summarizes the main characteristics of cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations, but also shows the five criteria required for mutations to be considered potentially pathogenic: type of mutation, typical clinical CADASIL syndrome, diffuse WMH, whole exon analysis, mutations that were not polymorphisms and GOM deposition, and the author.

Table 2. Clinical and demographic data of the patients with cysteine-sparing NOTCH3 mutations.

Numb.	Mutation	Origin	Sex	Smoker (n=7)	HT (n = 15)	DM (n = 13)	Dyslip (n = 11)	Clin. Onset (Years)	Migraine (n = 15)	Stroke (n=17)	Seizure (n = 5)	Psych. Disturb (n = 8)	Pseudb. Palsy (n = 5)	Demem (n = 18)	Gait Distur (n = 4)	FH ^a (n = 25)
1	p.R61W	USA	-	Yes	No	No	Yes	20	Yes	Yes	-	-	-	-	-	Yes
2	p.R75P	Korea	M	-	Yes	No	No	53	-	Yes	-	-	-	Yes	-	Yes
3	p.R75P	Korea	F	No	No	No	No	47	-	Yes	-	-	-	-	-	Yes
4	p.R75P	Korea	M	No	Yes	No	No	65	-	Yes	-	-	-	Yes	-	Yes
5	p.R75P	Japan	F	-	-	-	-	-	-	Yes	Yes	Yes	Yes	-	-	Yes
6	p.R75P	Japan	F	-	-	-	-	-	-	Yes	Yes	-	Yes	-	-	Yes
7	p.R75P	China	M	-	-	-	-	34	-	Yes	-	Yes	-	-	-	No
8	p.D80G	Germany	F	No	No	No	No	-	No	Yes	-	Yes	-	Yes	Yes	Yes
9	p.R107W	Germany	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
10	p.G149V	China	F	No	No	No	No	39	-	Yes	-	-	-	-	-	Yes
11	p.Q151E	Italy	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
12	p.Q151E	Spain	-	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	-	-
13	p.H170R	Spain	-	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	-	-
14	p.H170R	Oceania	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	p.A198T	Italy	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
16	p.A202V	Oceania	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	p.R207H	Italy	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
18	p.R213K	Japan	M	-	No	No	No	63	Yes	Yes	No	-	Yes	Yes	Yes	Yes
19	p.R213K	Japan	M	-	No	No	No	10	Yes	Yes	-	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	p.V237M	Japan	F	-	No	No	No	71	-	Yes	No	-	No	Yes	Yes	Yes
21	p.V252M	Russia	-	-	No	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	p.E309K	Italy	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
23	p.S497L	Russia	-	-	No	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	p.T577A	Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	p.R592S	Italy	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
26	p.V644D	Italy	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
27	p.S978R	Portugal	F	-	-	-	-	-	-	Yes	Yes	Yes	-	Yes	-	-
28	p.A1020P	Germany	F	-	Yes	-	-	Adolesc	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
29	p.A1020P	Germany	F	-	Yes	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	Yes
30	p.T1098S	China	M	-	-	-	-	39	-	Yes	-	Yes	-	Yes	-	Yes
31	p.H1133Q	Russia	-	-	No	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	p.H1235L	Italy	-	-	-	-	-	-	Yes	-	-	-	-	Yes	-	Yes
33	p.L1515P	France	F	No	No	No	No	35	Yes	Yes	-	-	-	-	-	Yes
34	p.V1762M	Italy	F	Yes	-	-	Yes	Childhd	Yes	-	-	Yes	-	No	-	Yes
Perc	-	-	-	29%	27%	0%	18%	-	93%	100%	60%	100%	80%	94%	100%	96%

Numb: Number; Smoker: current/past smoker; HT: hypertension; DM: diabetes mellitus; Dyslip: dyslipidaemia; Clin. Onset: Clinical Onset; Psych. Disturb: psychiatric disturbance; Pseudb.palsy: pseudobulbar palsy; Dem.: dementia; Gait distur: gait disturbance; GOM: Granular osmiophilic material; M: male; F: female; Adolesc: adolescence; Perc: percentage; ^a FH: family history; ^b LE TP: leukoencephalopathy with anterior temporal pole involvement; * GOM found in proband's siblings, who

Table 3. Summary of the main characteristics of cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations.

Number	Mutation	Typical Clinical CADASIL Syndrome	WMH	Whole Exon Analysis	Mutation	GOM
1	p.R61W	Yes	Yes	Yes	Yes	*
2	p.R75P	Yes	Yes	No	Yes	Ye
3	p.R75P	Yes	Yes	No	Yes	-
4	p.R75P	Yes	Yes	No	Yes	-
5	p.R75P	Yes	Yes	Yes	Yes	-
6	p.R75P	Yes	Yes	Yes	Yes	Ye
7	p.R75P	Yes	Yes	No	Yes	Ye
8	p.D80G	Yes	Yes	Yes	Yes	*
9	p.R107W	Yes	Yes	No	Yes	-
10	p.G149V	Yes	Yes	Yes	Yes	-
11	p.Q151E	Yes	Yes	No	Yes	-
12	p.Q151E	Yes	Yes	No	Yes	-
13	p.H170R	Yes	Yes	No	No	-
14	p.H170R	Yes	NS	No	No	-
15	p.A198T	Yes	Yes	No	Yes	-
16	p.A202V	Yes	NS	No	Yes	-
17	p.R207H	Yes	Yes	No	Yes	-
18	p.R213K	Yes	Yes	NS	Yes	-
19	p.R213K	Yes	Yes	Yes	Yes	Ye
20	p.V237M	Yes	Yes	NS	Yes	-
21	p.V252M	Yes	Yes	No	Yes	-
22	p.E309K	Yes	Yes	No	Yes	-
23	p.S497L	Yes	NS	No	No	-
24	p.T577A	NS	NS	NS	Yes	-
25	p.R592S	Yes	Yes	No	Yes	-
26	p.V644D	Yes	Yes	No	Yes	-
27	p.S978R	Yes	Yes	NS	Yes	-
28	p.A1020P	Yes	Yes	NS	No	Ye
29	p.A1020P	Yes	Yes	NS	No	No
30	p.T1098S	Yes	Yes	No	Yes	Ye
31	p.H1133Q	Yes	NS	No	No	-
32	p.H1235L	Yes	Yes	No	No	-
33	p.L1515P	Yes	Yes	Yes	Yes	No
34	p.V1762M	Yes	Yes	Yes	Yes	No

WMH: white matter hyperintensities; GOM: Granular osmiophilic material; NS: not specified; * GOM were found in proband's sibling, who

Therefore, we considered that p.R61W [23], p.R75P [25], p.D80G [27], and p.R213K [33] could be potentially pathogenic mutations, because they were associated with typical clinical CADASIL syndrome and extensive WMH in MRI, the 33 *NOTCH3* exons were analyzed and no other potential pathogenic mutations were found; they had an MAF < 0.1% (ExAC, 1000 Genomes Project) (confirming that they are not common polymorphisms) and GOM deposits were observed in the skin biopsy. (The criteria for considering mutations as potentially pathogenic are explained in the Material and Methods section).

In relation to co-segregation of these potentially pathogenic mutations, Mizuno et al. [25] studied the relatives of probands with the p.R75P mutation. Those with clinical CADASIL and typical MRI findings had the same p.R75P mutation, and the asymptomatic relative did not carry the mutation. For p.D80G, two sisters and one brother with clinical CADASIL typical syndrome and extensive WMH shared the same mutation, and the other asymptomatic brother did not share it. In addition, the symptomatic brother had GOM in his skin biopsy, unlike the asymptomatic one. Segregation analysis was not performed for p.R61W or p.R213K.

Of the ten probands that carried one of these four mutations, 80% were Asian, 60% had the p.R75P mutation and just one of the probands (p.D80G) had temporal pole involvement.

Polyphen-2 analysis indicated that p.R61W, p.D80G, and p.R75P could be possible damaging mutations (Table 4).

Table 4. Polyphen-2 results and domain localization of the selected mutations.

Mutation	Score	Confidence	Domain	Prediction
R61W	0.773	Sensitivity: 0.76 Specificity: 0.86	EGF-like 1	Possibly damaging
R75P	0.884	Sensitivity: 0.71 Specificity: 0.89	EGF-like 1	Possibly damaging
D80G	0.694	Sensitivity: 0.78 Specificity: 0.85	EGF-like 2	Possibly damaging
R213K	0.171	Sensitivity: 0.89 Specificity: 0.72	EGF-like 5	Benign

3. Discussion

In this systematic review, we conducted a thorough search for cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations in patients with typical clinical CADASIL syndrome in order to determine whether these mutations could be considered pathogenic and to describe the patients that carry this type of mutation.

We excluded nonsense and insertion/deletion mutations because they lead to a numerical cysteine alteration, as Rutten et al. described in a previous article [8].

The literature and gene databases describe 34 patients with 25 different cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations. These 25 mutations included two in exons that encode for the ICD. The patients presented typical clinical CADASIL syndrome with migraine, psychiatric disturbances, early onset of stroke and/or dementia, and diffuse WMH in the MRI.

We believe there are four possible pathogenic cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations: p.R61W [23], p.R75P [25], p.D80G [27], and p.R213K [33]. These mutations were located in EGF-like repeats. We think they are possible pathogenic mutations because patients presented typical clinical CADASIL syndrome and MRI profiles, no additional mutations were found in the gene, they do not represent low-frequency polymorphisms or subpolymorphic variants, and GOM deposits were found in their skin biopsy. A familial co-segregation was observed for p.R61W [23], p.D80G [27] and p.R75P [8,25], but not for p.R213K, because symptomatic relatives were not evaluated. In addition, Polyphen-2 analysis predicted that p.R61W, p.D80G, and p.R75P, but not p.R213K could be possibly

damaging mutations. Taking into account the information published in the literature these mutations can be considered possible pathogenic mutations.

Of the 10 probands with these four mutations and CADASIL patients with cysteine mutations, non-significant clinical or demographic differences were observed in migraine, stroke, or dementia. However, WMH in the anterior part of the temporal pole were practically absent in these cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations. As mentioned previously, WMH in the temporal pole has a reported 89–95% sensitivity and 80–86% specificity for CADASIL in Caucasian patients [14] and a prevalence of 44.8–71% [16] in Asian populations. Therefore, considering that 80% of patients in the review were Asians, at least four to five patients with temporal pole involvement should be expected in CADASIL due to cysteine mutations. Therefore, we believe that absent temporal pole involvement could be a characteristic of cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations.

Rutten et al. performed an extensive search of all types of *NOTCH3* mutations in order to provide information on their interpretation [8]. Regarding the cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations, they studied 10 articles with 11 different mutations corresponding to p.R61W, p.R75P, p.Q151E, p.H170R, p.A202V, p.R213K, p.V237M, p.T577A, p.S978R, p.A1020P, and p.Y1098S. They concluded that these mutations were not associated with CADASIL, but p.R75P fulfilled all their criteria: (1) a complete evaluation of the *NOTCH3* gene to rule out a typical cysteine-altering mutation in another exon; (2) the mutations were not polymorphisms; (3) a familial co-segregation was proven; and (4) the clinical diagnosis was confirmed through the observation of GOM deposits in the skin biopsy.

This systematic review updates the interesting work of Rutten et al. [8], taking into consideration three of the four criteria that they applied, excluding the lack of familiar segregation criterion [8]. We were able to add new information and conclusions stemming from the publication of new articles with a total of 25 different mutations, in contrast to the 11 found previously by Rutten et al. Of the four mutations considered potentially pathogenic in our systematic review, p.R75P was already mentioned by Rutten et al. in their reference to Mizuno et al. In this review, we added information from two new articles with a total of four new patients. Regarding p.R213K, Rutten et al. did not consider this mutation as potentially pathogenic because familial co-segregation was not proven. However, we did not define familial co-segregation as an exclusion criterion because it is not always possible to analyze relatives or there may be no live relatives.

The genetic analysis technique was not specified for p.R61W, so Rutten et al. suggested the possibility of using a technique that would not detect other mutations.

Finally, p.D80G was not studied previously by Rutten et al., but applying their criteria and ours, it is a pathogenic mutation.

In several cases, the conclusions of these articles are supported by bioinformatics and functional studies that have revealed the possible pathogenic effect of the mutations [37,39]. Mizuno et al. suggested that changes in *NOTCH3* structure could be related to the replacement of an amino acid by proline (without cysteine involvement), because three-dimensional structure studies have shown that it helps to stabilize the β -sheet [25]. This may lead to a conformational change in the protein. Another study observed that several of these atypical mutations were associated with structural changes in the *NOTCH3* receptor [39], similar to the mechanism observed for typical mutations involving cysteines. Thus, in addition to changes in the number of cysteines, mutations involving other amino acids could also lead to misfolding of the receptor. In the same way, *in vitro* studies with p.R75P, p.D80G, and delta88–91 have shown significantly enhanced aggregation similar to that of cysteine mutations [27].

With regard to limitations, we should consider the low number of cases reported so far, as well as the high number of Asian reports that could skew the frequencies of different features in this population. In order to avoid this last limitation, we compared some important characteristics (such as the temporal pole affection) to their frequency in the Asian population.

Another limitation is that the analyses of p.R213K [33] to rule out other mutations in the *NOTCH3* gene were performed using single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis, which does

not detect other mutations, unlike the standard and reliable Sanger sequencing. In the case of p.R61W, the genetic analysis technique was not specified.

Furthermore, we did not consider a small deletion (delta88–91) that does not directly involve a cysteine residue in the ECD of *NOTCH3* [39]. This would have enriched our review, but could have compromised the reliability of our conclusions. This deletion was reported in an Italian family with typical clinical CADASIL syndrome and diffuse WMH, without anterior temporal pole involvement. In addition, the proband's skin biopsy showed GOM deposits. This mutation was also observed in the only symptomatic relative. The asymptomatic relatives did not carry any *NOTCH3* mutations.

Another limitation was combining ECD and ICD mutations in our review. The aim here was to review typical clinical CADASIL syndrome with cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations to determine whether they were associated with CADASIL. In any case, ICD mutations were not considered pathogenic because GOM deposits were absent.

4. Materials and Methods

An extensive literature search was performed up to November 2016 on PubMed, Google Scholar, EMBASE, LILACS, Trip Database, and the Cochrane Library, as well as in “The Human Gene Mutation Database” (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), with the key words: “CADASIL cysteine”, “*NOTCH3* cysteine”, and “*NOTCH3* polymorphism”, in order to collect data about cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations that were associated with typical clinical CADASIL syndrome.

A total of 244 studies were found. Probands had typical clinical CADASIL syndrome and a cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutation (Figure 1) in 18 articles. Studies that analyzed other diseases or endophenotypes, such as patients with diffuse WMH instead of a typical clinical CADASIL syndrome, were excluded.

Only those articles that described missense mutations confirming an absence of cysteine involvement were selected. Therefore, nonsense, intronic, insertion, and deletion mutations were excluded because they can lead to cysteine number alterations, through the shortening of the protein (in the case of nonsense mutations) [40,41] and/or through changes in the open reading frame (in the case of insertion-deletions) as described previously [8,42].

In addition, we excluded several studies describing mutations that were already known polymorphisms, suggesting a negative pathogenic role, as well as an article by Ueda et al. [16], as it was difficult to identify who was the proband and who was the relative of the patient with the typical clinical CADASIL syndrome.

We collected data on epidemiological, clinical, genetic, and neuroimaging characteristics, such as temporal pole involvement, as well as existence of skin biopsies. We used the IBM SPSS statistics software package, version 22, for the frequencies analysis.

Mutations were considered potentially pathogenic when they fulfilled the following criteria: (1) the patients had typical clinical CADASIL syndrome; (2) the patients had diffuse WMH in MRI; (3) the study analyzed the 33 exons of the *NOTCH3* gene to rule out other pathogenic mutations; (4) the mutation had a MAF < 0.1%, since CADASIL is a low prevalence disease and it is therefore necessary to rule out low-frequency polymorphisms (MAF < 5%) and subpolymorphic variants (frequency 0.1–1.0%) that could represent rare variants and not disease-causing mutations. To establish the MAF, we used the ExAC database, containing genetic information on 60,706 unrelated individuals (<http://exac.broadinstitute.org>), and the 1000 Genomes Project database, containing the genetic information of 1000 individuals from different ethnicities (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/>); and lastly (5) the patient had GOM deposits in the skin biopsy because this represents a specificity of 100% for CADASIL diagnosis. Finally we analyzed with Polyphen-2 tool the pathogenic prediction of the selected mutations that we considered potentially pathogenic (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

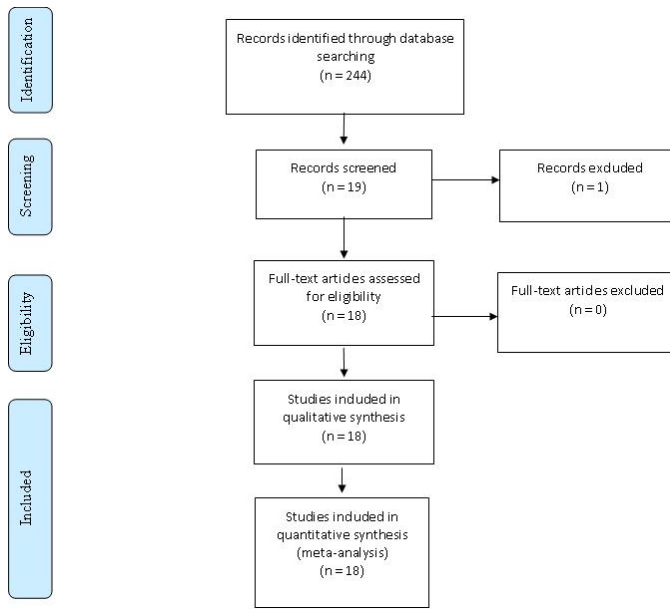


Figure 1. Flow diagram of the literature review. This detailed flow diagram depicts the search and selection processes.

5. Conclusions

We believe that the cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations p.R61W, p.R75P, p.D80G, and p.R213K could be potentially pathogenic, and we found familial co-segregation for p.R61W, p.R75P, and p.D80G. Different studies confirmed an altered *NOTCH3* structure or proaggregatory properties due to these changes. Thus, cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations are associated with typical clinical CADASIL syndrome and a typical MRI profile, mostly without anterior temporal pole involvement.

Further studies are necessary to clarify the role of these cysteine-sparing *NOTCH3* missense mutations in CADASIL to be able to interpret them properly to reach a correct diagnosis. Likewise, an improved understanding of this kind of mutation would be important to clarify whether other mechanisms, apart from disulfide bond-mediated misfolding due to an odd number of cysteines, play a major role in the development of CADASIL, such as a receptor misfolding produced by other amino acids.

Acknowledgments: The Stroke Genetics and Pharmacogenomics Laboratory is part of the International Stroke Genetics Consortium (ISGC, www.strokegenetics.com) and coordinates the Spanish Stroke Genetics Consortium (Genestroke, www.genestroke.com). Israel Fernández-Cadenas is supported by the Miguel Servet programme (CP12/03298), Instituto de Salud Carlos III. This study was funded by the Miguel Servet grant (Pharmastroke project: CP12/03298). The Neurovascular Research Laboratory is supported by the INVICTUS Network of the Spanish Ministry of Health (Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III). The IMIM-Hospital del Mar Neurology Service is supported in part by the Spanish Ministry of Health (Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III FEDER, RD12/0042/0020).

Author Contributions: Elena Muiño and Israel Fernández-Cadenas conceived and wrote the paper; Cristina Gallego-Fabrega, Natalia Cullell, Caty Carrera, Nuria Torres, Jurek Krupinski, Jaume Roquer, and Joan Montaner contributed by correcting the paper in their respective fields of biotechnology, biology, genetics and neurology.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

CADASIL	Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and Leukoencephalopathy
ECD	Extracellular domain
EGF	Epidermal growth factor
ICD	Intracellular domain
MRI	Magnetic resonance imaging
WMH	White matter hyperintensities
GOM	Granular osmiophilic material
MAF	Minor allele frequency
ExAC	Exome aggregation consortium

References

1. Tournier-Lasserre, E.; Joutel, A.; Melki, J.; Weissenbach, J.; Lathrop, G.M.; Chabriat, H.; Mas, J.L.; Cabanis, E.A.; Baudrimont, M.; Maciazek, J.; et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat. Genet.* **1993**, *3*, 256–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Joutel, A.; Corpechot, C.; Ducros, A.; Vahedi, K.; Chabriat, H.; Mouton, P.; Alamowitch, S.; Domenga, V.; Cecillion, M.; Marechal, E.; et al. NOTCH3 mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. *nm. N. Y. cad. Sci.* **1997**, *826*, 213–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dziewulska, D.; Lewandowska, E. Pericytes as a new target for pathological processes in CADASIL. *Neuropathology* **2012**, *32*, 515–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Duering, M.; Karpinska, A.; Rosner, S.; Hopfner, F.; Zechmeister, M.; Peters, N.; Kremmer, E.; Haffner, C.; Giese, A.; Dichgans, M.; et al. Co-aggregate formation of CADASIL-mutant NOTCH3: A single-particle analysis. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 3256–3265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Meng, H.; Zhang, X.; Yu, G.; Lee, S.J.; Chen, Y.E.; Prudovsky, I.; Wang, M.M. Biochemical characterization and cellular effects of CADASIL mutants of NOTCH3. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Opher, C.; Duering, M.; Peters, N.; Karpinska, A.; Rosner, S.; Schneider, E.; Bader, B.; Giese, A.; Dichgans, M. CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 2761–2767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cognat, E.; Baron-Menguy, C.; Domenga-Denier, V.; Cleophax, S.; Fouillade, C.; Monet-Leprêtre, M.; Dewerchin, M.; Joutel, A. Archetypal Arg169Cys mutation in NOTCH3 does not drive the pathogenesis in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy via a loss-of-function mechanism. *Stroke* **2014**, *45*, 842–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Rutten, J.W.; Haan, J.; Terwindt, G.M.; van Duinen, S.G. Interpretation of NOTCH3 mutations in the diagnosis of CADASIL. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14*, 593–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Joutel, A. Transgenic and knock-out mice to probe function and dysfunction of the mutated gene, NOTCH3, in the cerebrovasculature. *Bioessays* **2011**, *33*, 73–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Chabriat, H.; Vahedi, K.; Iba-Zizen, M.T.; Joutel, A.; Nibbio, A.; Nagy, T.G.; Krebs, M.O.; Julien, J.; Dubois, B.; Ducrocq, X.; et al. Clinical spectrum of CADASIL: A study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet* **1995**, *346*, 934–939. [[CrossRef](#)]
11. Moreton, F.C.; Razvi, S.S.M.; Davidson, R.; Muir, K.W. Changing clinical patterns and increasing prevalence in CADASIL. *Acta Neurol. Scand.* **2014**, *130*, 197–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Adib-Samii, P.; Brice, G.; Martin, R.J.; Markus, H.S. Clinical spectrum of CADASIL and the effect of cardiovascular risk factors on phenotype: Study in 200 consecutively recruited individuals. *Stroke* **2010**, *41*, 630–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Cumurciuc, R.; Guichard, J.-P.; Reizine, D.; Gray, F.; Bousser, M.G.; Chabriat, H. Dilation of Virchow-Robin spaces in CADASIL. *Eur. J. Neurol.* **2006**, *13*, 187–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. O'Sullivan, M.; Jarosz, J.M.; Martin, R.J.; Deasy, N.; Powell, J.F.; Markus, H.S. MRI hyperintensities of the temporal lobe and external capsule in patients with CADASIL. *Neurology* **2001**, *56*, 628–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Markus, H.S.; Martin, R.J.; Simpson, M.A.; Dong, Y.B.; Ali, N.; Crosby, A.H.; Powell, J.F. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology* **2002**, *59*, 1134–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ueda, A.; Ueda, M.; Nagatoshi, A.; Hirano, T.; Ito, T.; Arai, N.; Uyama, E.; Mori, K.; Nakamura, M.; Shinriki, S.; et al. Genotypic and phenotypic spectrum of CADASIL in Japan: The experience at a referral center in Kumamoto University from 1997 to 2014. *J. Neurol.* **2015**, *262*, 1828–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ishiko, A.; Shimizu, A.; Nagata, E.; Takahashi, K.; Tabira, T.; Suzuki, N. NOTCH3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol.* **2006**, *112*, 333–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Chabriat, H.; Joutel, A.; Dichgans, M.; Tournier-Lasserre, E.; Bousser, M.G. Cadasil. *Lancet Neurol.* **2009**, *8*, 643–653. [[CrossRef](#)]
19. Joutel, A.; Favrole, P.; Labauge, P.; Chabriat, H.; Lescoat, C.; Andreux, F.; Domenga, V.; Cécillon, M.; Vahedi, K.; Ducros, A.; et al. Skin biopsy immunostaining with a NOTCH3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet* **2001**, *358*, 2049–2051. [[CrossRef](#)]
20. Shan, S.; He, X.; He, L.; Wang, M.; Liu, C. Coexistence of congenital left ventricular aneurysm and prominent left ventricular trabeculation in a patient with LDB3 mutation: A case report. *J. Med. Case Rep.* **2017**, *11*, 229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Dastsooz, H.; Nematii, H.; Fard, M.A.F.; Fardaei, M.; Faghihi, M.A. Novel mutations in PANK2 and PLA2G6 genes in patients with neurodegenerative disorders: Two case reports. *BMC Med. Genet.* **2017**, *18*, 87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mendioroz, M.; Fernandez-Cadenas, I.; del Río-Espinola, A.; Rovira, A.; Solé, E.; Fernandez-Figueras, M.T.; Garcia-Patos, V.; Sastre-Garriga, J.; Domingues-Montanari, S.; Alvarez-Sabin, J.; et al. A missense HTRA1 mutation expands CARASIL syndrome to the Caucasian population. *Neurology* **2010**, *75*, 2033–2035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Frosch, M.P. A 46-year-old man with migraine, aphasia, and hemiparesis and similarly affected family members. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1656–1665.
24. Kim, Y.; Choi, E.J.; Choi, C.G.; Kim, G.; Choi, J.H.; Yoo, H.W.; Kim, J.S. Characteristics of CADASIL in Korea: A novel cysteine-sparing NOTCH3 mutation. *Neurology* **2006**, *66*, 1511–1516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mizuno, T.; Muranishi, M.; Torugun, T.; Tango, H.; Nagakane, Y.; Kudaken, T.; Kawabe, K.; Oshima, F.; Yaoi, T.; Itoh, K.; et al. Two Japanese CADASIL families exhibiting NOTCH3 mutation R75P not involving cysteine residue. *Intern. Med.* **2008**, *47*, 2067–2072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wang, Z.; Yuan, Y.; Zhang, W.; Lv, H.; Hong, D.; Chen, B.; Liu, Y.; Luan, X.; Xie, S.; Wu, S. NOTCH3 mutations and clinical features in 33 mainland Chinese families with CADASIL. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2011**, *82*, 534–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wollenweber, F.A.; Hanecker, P.; Bayer-Karpinska, A.; Malik, R.; Bzner, H.; Moreton, F.; Muir, K.W.; Müller, S.; Giese, A.; Opherck, C.; et al. Cysteine-sparing CADASIL mutations in NOTCH3 show proaggregatory properties in vitro. *Stroke* **2015**, *46*, 786–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ungaro, C.; Mazzei, R.; Conforti, F.L.; Sprovieri, T.; Servillo, P.; Liguori, M.; Citrigno, L.; Gabriele, A.L.; Magariello, A.; Patitucci, A.; et al. Cadasil: Extended polymorphisms and mutational analysis of the NOTCH3 gene. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 1162–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ge, W.; Kuang, H.; Wei, B.; Bo, L.; Xu, Z.; Xu, X.; Geng, D.; Sun, M. A novel cysteine-sparing NOTCH3 mutation in a Chinese family with CADASIL. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ampuero, I.; Alegre-Abarrategui, J.; Rodal, I.; España, A.; Ros, R.; Sendón, J.L.L.; Galloway, E.G.; Cervelló, A.; Caminero, A.B.; Zabala, A.; et al. On the diagnosis of CADASIL. *J. Alzheimers Dis.* **2009**, *17*, 787–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Roy, B.; Maksemous, N.; Smith, R.A.; Menon, S.; Davies, G.; Griffiths, L.R. Two novel mutations and a previously unreported intronic polymorphism in the NOTCH3 gene. *Mutat. Res.* **2012**, *732*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Uchino, M.; Hirano, T.; Uyama, Y.H.E. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) and CADASIL-like disorders in Japan. *Am. J. Pathol.* **2002**, *159*, 273–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Santa, Y.; Uyama, E.; Chui, D.H.; Arima, M.; Kotorii, S.; Takahashi, K.; Tabira, T. Genetic, clinical and pathological studies of CADASIL in Japan: A partial contribution of NOTCH3 mutations and implications of smooth muscle cell degeneration for the pathogenesis. *J. Neurol. Sci.* **2003**, *212*, 79–84. [[CrossRef](#)]
34. Abramycheva, N.; Stepanova, M.; Kalashnikova, L.; Zakharova, M.; Maximova, M.; Tanashyan, M.; Lagoda, O.; Fedotova, E.; Klyushnikov, S.; Kononov, R.; et al. New mutations in the NOTCH3 gene in patients with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *J. Neurol. Sci.* **2015**, *349*, 196–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Homer, V.; George, P.M.; Toit, S.; Davidson, J.S.; Wilson, C.J. Novel human pathological mutations. *Hum. Genet.* **2007**, *121*, 645–652. [[PubMed](#)]
36. Scheid, R. Cysteine-sparing NOTCH3 mutations: CADASIL or CADASIL variants? *Neurology* **2008**, *71*, 774–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fouillade, C.; Chabriet, H.; Riant, F.; Mine, M.; Arnoud, M.; Magy, L.; Bousser, M.G.; Tournier-Lasserre, E.; Joutel, A. Activating NOTCH3 mutation in a patient with small-vessel-disease of the brain. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bersano, A.; Dotti, M.T.; Candelise, L. Considerations on a mutation in the NOTCH3 gene sparing a cysteine residue: A rare polymorphism rather than a CADASIL variant. *Funct. Neurol.* **2012**, *27*, 247–252. [[PubMed](#)]
39. Vlachakis, D.; Tsaniras, S.C.; Ioannidou, K.; Baumann, M.; Kossida, S. A series of NOTCH3 mutations in CADASIL, insights from 3D molecular modelling and evolutionary analyses. *J. Mol. Biochem.* **2014**, *3*, 97–105.
40. Mazzei, R.; Conforti, F.L.; Lanza, P.L.; Sprovieri, T.; Lupo, M.R.; Gallo, O.; Patitucci, A.; Magariello, A.; Caracciolo, M.; Gabriele, A.L.; et al. A novel NOTCH3 gene mutation not involving a cysteine residue in an Italian family with CADASIL. *Neurology* **2004**, *63*, 561–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Arboleda-Velasquez, J.F.; Manent, J.; Lee, J.H.; Tikka, S.; Ospina, C.; Vanderburg, C.R.; Frosch, M.P.; Rodríguez-Falcón, M.; Villen, J.; Gygi, S.; et al. Hypomorphic Notch 3 alleles link Notch signaling to ischemic cerebral small-vessel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 128–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Fernandez-Cadenas, I.; Andreu, A.L.; Gamez, J.; Gonzalo, R.; Martín, M.A.; Rubio, J.C.; Arenas, J. Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease. *Neurology* **2003**, *61*, 1432–1434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).