



## Revisión

## Fisiopatología del CADASIL

Alberto del Río Espínola<sup>a</sup>, Esther Solé<sup>b</sup> y Joan Montaner<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratorio de Investigación Neurovascular, Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebrón Barcelona, España<sup>b</sup> Unidad de Biología Molecular, Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

## Historia del artículo:

Recibido el 10 de marzo de 2009

Aceptado el 22 de octubre de 2009

On-line el 29 de diciembre de 2009

## Palabras clave:

Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía

NOTCH3

Mal plegamiento proteico

Ictus genético

Demencia vascular

## RESUMEN

El mecanismo patogénico de la *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy* (CADASIL, 'arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía') todavía no se conoce, aunque la enfermedad está bien caracterizada a nivel clínico, histológico y genético. La conservación de la vía de Notch en la evolución ha permitido el desarrollo de numerosos modelos animales y celulares para su estudio. En esta revisión se discutirá la validez de los 7 modelos patogénicos propuestos para CADASIL: origen autoinmunitario, afectación mitocondrial, disfunción en la producción de elastina, problemas en la glucosilación del receptor, pérdida de función de *NOTCH3*, toxicidad de los gránulos osmiófilos y activación prolongada de la respuesta al mal plegamiento proteico. Se tratará, también, la relación entre la degeneración de las células musculares lisas vasculares, las lesiones isquémicas y la sintomatología. Por último, se apuntarán las diferentes teorías para explicar por qué la expresión clínica se circunscribe al sistema nervioso si se trata de una arteriopatía sistémica.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Pathophysiology of CADASIL disease

## ABSTRACT

The pathogenic mechanism underlying Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) remains elusive although the disease is well characterized at clinical, histological and genetic level. The conservation of the Notch pathway among species allowed the development of several animal and cellular models in order to study it. This review analyzes the reliability of the 7 pathogenic models raised for CADASIL disease: autoimmune origin, mitochondrial dysfunction, loss of Notch3 function, granular osmiophilic material (GOM) toxicity and long term unfolded protein response (UPR) activation. Besides, the relationship between vascular smooth muscle cells (VSMC) degeneration, ischemic lesions and symptoms are discussed. Lastly, some theories are pointed that would explain the exclusiveness of clinical expression to the neural system, being in fact a systemic arteriopathy.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Keywords:

Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy

NOTCH3

Unfolded protein response

Genetic stroke

Vascular dementia

## Introducción

La arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL) es una angiopatía sistémica, de herencia autosómica dominante, caracterizada por migraña e infartos lacunares de repetición que evoluciona hacia demencia vascular. La CADASIL está causada por mutaciones del gen *NOTCH3*, situado en el cromosoma 19<sup>1</sup>. Se han descrito más de 150 mutaciones puntuales, localizadas en las repeticiones *epidermal growth factor* del dominio extracelular del receptor (N3ECD), que afectan casi exclusivamente a residuos de cisteína.

La familia de genes *Notch* codifican para receptores transmembranales implicados en el proceso de crecimiento y diferenciación celular durante el desarrollo<sup>2</sup>. Estos transductores son heterodímeros, con un dominio C-terminal intracelular con actividad señal-transdutora y un dominio N-terminal extracelular con la región de unión al ligando y la actividad reguladora; se encuentran muy conservados durante la evolución, lo que ha permitido el desarrollo de modelos animales en mosca<sup>3</sup>, nematodo, pez cebra o ratón<sup>4-6</sup>. El receptor Notch3 apareció tardíamente en la evolución y sólo puede estudiarse directamente en vertebrados (tabla 1). El Notch3 es necesario para el desarrollo tímico, neurológico y vascular<sup>7,8</sup>. Las únicas células maduras que mantienen activa la expresión de *NOTCH3* son las *vascular smooth muscle cell* (VSMC, 'células musculares lisas del tejido vascular arterial') y los pericitos; estos son los tipos celulares afectados primariamente en la CADASIL. Además, el receptor

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: 31862jmv@comb.cat (J. Montaner).

**Tabla 1**  
Modelos animales para el estudio del receptor *NOTCH3*

Estudio	Tejido diana	Metodología	Cepa	Fenotipo
<i>Danio Rerio</i> Modelos KO* Jiang et al, 1996*	Global	Alelo <i>mib</i> <sup>ta52b</sup> , M1013R	Línea Tubingen	Defectos somitogénesis, dif. neural y arteriovenosa
Jiang et al, 1996*	Global	Alelo <i>mib</i> <sup>m178</sup> , C785stop	Línea Tubingen	Defectos somitogénesis, dif. neural y arteriovenosa
Lawson et al, 2001*	Global	Ins.SP6-SuH DN	Línea EK	Defectos somitogénesis, dif. neural y arteriovenosa
<i>Modelos sobreexpresión</i> Lawson et al, 2001	Global	Ins. mARN N3ICD	Línea EK	Defectos somitogénesis y notocordia
Lawson et al, 2001	Endotelio	Ins. <i>Fli1</i> -N3ICD	Línea EK	Dif. arterial forzada (↓ <i>flt4</i> )
<i>Mus Musculus</i> Modelos KO Mitchell et al, 2001	Global	Trampa de secreción 1% expresión RER	No publicado	Vasorreactividad deficiente, mayor PID y tamaño de infarto en mCAO. Microarrays realizados
Kitamoto et al, 2003	Global	Disrupción exón 4	129S1/SvImj	Timo reducido, número menor células T
Krebs et al, 2003	Global	Delección EGF 8-12	129S1/SvImj y 129S1/SvImj x C57BL/6J	No dif. arteriovenosa, tono miogénico reducido, expresión menor PDGF-Rβ
Krebs et al, 2003	Global	Disrupción EGF 32 (N1) x del. EGF 8-12 (N3)	C57BL/6 o 129/Sv (N1) x 129S1/SvImj [129S1/SvImj x C57BL/6J] N3)	Letalidad embrionaria, idéntica KO N1
<i>Modelos sobreexpresión</i> Lardelli et al, 1996	Progenitor neural	Ins. <i>nestin</i> -N3ICD	CBA x C57BL/6	Letalidad embrionaria. Afecta cola, columna y SNC
Apelqvist et al, 1999	Páncreas	Ins. <i>Ipf1/Pdx1</i> -N3ICD	No publicado	No hay diferenciación exocrina
Bellavia et al, 2000	Timo	Ins. <i>lck</i> -N3ICD	C57BL/6	Ausencia de población CD4-8-, leucemia en células T
Bellavia et al, 2002	Timo	Ins. <i>lck</i> -N3ICD, delección Exones 3 y 4 pTα	C57BL/6	Tasa menor leucemia en células T, mayor longevidad
Dang et al, 2003	Pulmón	Ins. SP-C-N3ICD	B6D2	Letalidad perinatal, epitelio pulmonar indiferenciado
Hu et al, 2006	Mama	Ins. N3ICD con MMTV	CD1 y Balbc/CD1	Ausencia de lactancia en hembras, infertilidad en machos
<i>Modelos de mutación</i> Ruchoux et al, 2003	VSMC y pericitos retinianos	Adición R90C humano	C57BL6	Muerte VSMC, GOM, mecanotransducción y tono miogénico incrementados. N3 mutado es funcional
Lundqvist et al, 2005	Global	Mutación R142C	C57BL6 x 129	Normal
Monet-Leprêtre et al, 2008	VSMC y pericitos retinianos	Adición C428S humano	C57BL6	Muerte VSMC, GOM, mecanotransducción y tono miogénico incrementados. N3 mutado no es funcional

CD: *cluster differentiation*; delec.: delección; dif.: diferenciación; DN: dominante negativo; EGF: *epidermal growth factor*; *flt4*: *Fms-related tyrosine kinase 4*; GOM: material granular osmiofílico; Ins.: inserción; KO: *knock-out*; mARN: ácido ribonucleico mensajero; MCAO: oclusión de la arteria cerebral media; *mib*: *mind bomb*; MMTV: *mouse mammary tumor virus*; N1: Notch1; N3: Notch3; N3ICD: dominio intracelular de N3; PDGF-Rβ: receptor beta del factor de crecimiento plaquetar; PID: despolarización periinfarto; pTα: *pre-T cell receptor α chain*; RER: retículo endoplasmático rugoso; SNC: sistema nervioso central; SuH: *suppressor of hairless*; VSMC: células musculares lisas vasculares.

\* Al no haber modelos KO de NOTCH3, se indican KO globales de la vía de Notch (*mib* y *SuH*).

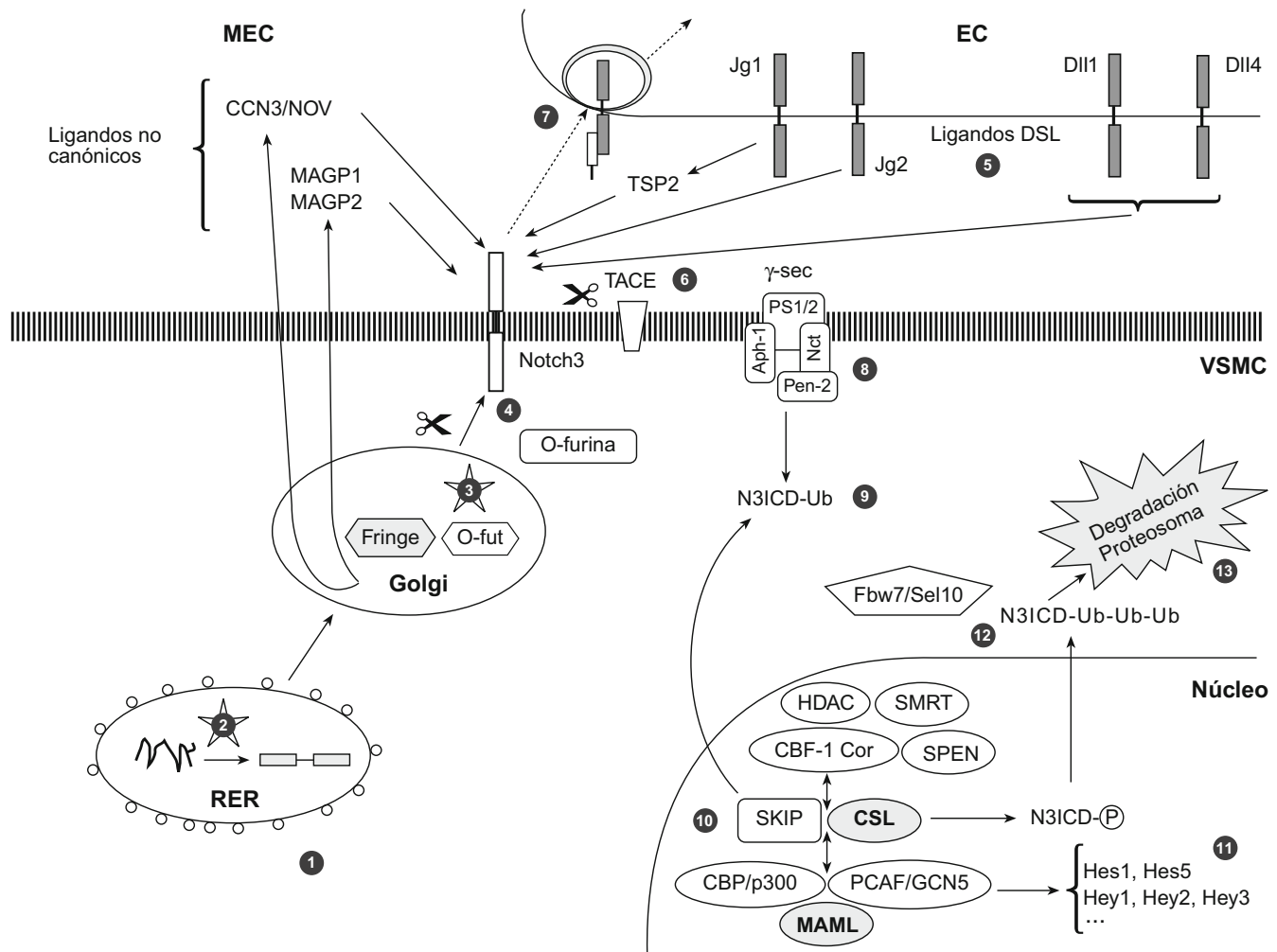
Notch3 está implicado en numerosas neoplasias donde se sobreexpresa el receptor, en los que constituye una diana terapéutica.

### NOTCH3, función y funcionamiento

Para determinar la función de los diversos receptores *NOTCH*, se han desarrollado ratones *knock-out* (KO), que en su mayoría presentan letalidad embrionaria. Sin embargo, los ratones KO para *NOTCH3* son viables y fértiles y han permitido identificar por microarrays las vías metabólicas en las que el Notch3 interviene: desarrollo muscular y del mesodermo, estructura celular y contracción muscular<sup>7</sup>. El *NOTCH3* también está implicado en el proceso de diferenciación arteriovenosa<sup>8,9</sup> y en la regulación del tono miogénico en las arterias de pequeño calibre<sup>10</sup>. Curiosamente, los problemas de vasorreactividad de los KO son específicos de las arteriolas cerebrales, y se mantienen intactas las capacidades contráctiles de las arterias aorta y carótida<sup>7,10</sup>. Además, el déficit de Notch3 también confiere una mayor sensibilidad a la isquemia y un incremento en las tasas de despolarización isquémica en el

área periinfarto (PID, *peri-infarct depolarization*)<sup>7</sup>. Por otro lado, los modelos de sobreexpresión de Notch3 se han encaminado a elucidar su perfil prooncogénico, y aportan poca información sobre los procesos anteriormente mencionados.

Los efectos de la señalización en esta familia dependen del ligando con el que interactúa y del ambiente que rodea a la célula (fig. 1). Esto se debe a la regulación de la vía en múltiples niveles<sup>11</sup>: a nivel de expresión (fig. 1.1); en la N-glucosilación, que determina la capacidad de unión a ligando *delta-serrate-lag2* (fig. 1.3); el tipo de ligando disponible (fig. 1.5); el proceso de activación (fig. 1.6 y 1.7); el punto de corte de G-secretasa (fig. 1.8), que condiciona la estabilidad del fragmento del dominio intracelular de Notch (N3ICD) y la ubiquitinación del N3ICD y su capacidad de endocitosis al núcleo (fig. 1.9)<sup>12</sup>, que condiciona la intensidad y duración de la señal. Las mutaciones propias de la CADASIL, por hallarse en el N3ECD, podrían afectar a la vía clásica del receptor desde la traducción hasta el segundo corte proteolítico de activación (fig. 1.1-1.7); se han propuesto la formación de puentes bisulfuro (fig. 1.2)<sup>13</sup> y la glucosilación por Fringe (fig. 1.3)<sup>14</sup> como los procesos afectados por la mutación.



**Figura 1.** Esquema de funcionamiento del receptor Notch3 y vías de activación. Notch3 se traduce en el retículo endoplasmático rugoso (1), donde se forman los puentes bisulfuro (2). Acto seguido, O-glucosiltransferasa y Fringe lo glucosilan en Golgi (3). Durante el trayecto, O-Furina lo corta (4) y adquiere la conformación en heterodímero, manteniendo unidos el dominio extracelular del receptor y el dominio intracelular del receptor (N3ICD) por un enlace no covalente. Al activarse por la unión de ligando (5), TNF- $\alpha$  converting enzyme lo corta (6) y se libera el fragmento extracelular (7), que es endocitado por la célula del ligando, mientras que un tercer corte proteolítico por  $\gamma$ -secretasa (8) libera el fragmento intracelular que viaja al núcleo de la célula receptora (9). En el núcleo, N3ICD forma un complejo ternario con CBF1/SuH/Lag1 homolog y mastermind-like; desplaza un complejo represor formado por (silencing-mediator for retinoid/thyroid hormone receptor, split ends homolog, correpresor CBF1, e histona deacetilasa) y se une a otro coactivador formado por (histona acetiltransferasa, CREB [cAMP-response-element-binding protein]-binding protein/p300) (10). En el proceso de intercambio entre represores y activadores participaría el factor ski-interacting protein (11). La señal termina cuando N3ICD es fosforilado, poliubiquitinado por F-box and WD (triptófano-aspartato) repeat domain containing protein 7 (12) y degradado por el proteosoma. (13). (P): fosforilación; CBF1 coR: correpresor de CBF1; CCN3 o NOV: *nephroblastoma overexpressed gene*; Dll1 y 4: *delta-like 1 y 4*; DSL: *delta/serrate/lag-2*;  $\gamma$ -sec:  $\gamma$ -secretasa (formada por PS1/2: *presenilinas 1 y 2*; Aph-1: *anterior pharynx defective 1*, Nct: *nicastrin*; Pen-2: *presenilin enhancer 2*); EC: célula endotelial; MEC: matriz extracelular; Hes1 y 5: *hairy and enhancer of split 1 y 5*; Hey1, 2 y 3: *Hairy/E(spl)-related with YRPW motif 1, 2 y 3*; Jg1 y 2: *jagged 1 y 2*; MAGP-1 y 2: *microfibril-associated glycoprotein 1 y 2*; N3ICD: dominio intracelular de Notch3; O-fut: O-fucosil transferasa; TSP2: trombospodina 2; Ub: ubiquitinación; VSMC: célula muscular lisa vascular.

La complejidad de la señalización aumenta cuando se consideran los numerosos ligandos no canónicos descritos recientemente<sup>15</sup>. Estos ligandos, de los que cabría destacar *neuroblastoma overexpressed gene* y *matrix associated glycoproteins 1 y 2*, provocarían una señalización autocrina, adecuada para células rodeadas de una amplia matriz extracelular (MEC) como las VSMC<sup>15</sup>. Por último, moléculas de MEC pueden modular la señal producida por ligandos *delta-serrate-lag2*<sup>16</sup>.

### Anatomía patológica

Al contrario de la sintomatología clínica, mayoritariamente neurológica, la arteriopatía de la CADASIL es sistémica, y se afectan las arterias del cerebro, el músculo, los nervios periféricos, la piel, el intestino grueso y el intestino delgado, el hígado, el riñón y el corazón<sup>17,18</sup>. También se producen alteraciones en los niveles de polisacáridos en el tejido cerebral, el corazón, el riñón,

el hígado y el pulmón<sup>19</sup>, aunque se desconoce su papel en la evolución de la enfermedad.

Una característica patognomónica de la enfermedad es la aparición de cúmulos de un material granular electrodensito (GOM) que se intercala con las VSMC, detectables por microscopía electrónica y óptica. La densidad del material disminuye conforme se incrementa la distancia respecto a las VSMC y los pericitos<sup>17</sup>. Los gránulos miden entre 10 y 15 nm de diámetro, y forman cúmulos que pueden superar 1 mm<sup>17</sup>. Los cambios aparecen en un período comprendido entre las 14 semanas y los 9 años, ya que un feto de 14 semanas no mostró alteraciones ni presencia de GOM en el cerebro, el corazón, el intestino, el tejido vertebral, las articulaciones, la placenta o el cordón umbilical<sup>20</sup>, pero se observaron cambios importantes en una paciente de 9 años (Ruchoux, datos no publicados).

Se han realizado diversas tentativas para caracterizar la composición de los GOM, pues podrían ser clave para dilucidar el mecanismo de la enfermedad. Son de origen celular, como se observa en el

trícromico de Masson y su composición es de material eosinófilo o débilmente basófilo en hematoxilina-eosina. Contiene ácidos polisacáridos<sup>18</sup> y bajo contenido en sulfatos y fosfatos<sup>21</sup>; queda en duda la carga de lipoproteínas. Sus componentes definidos son el N3ECD<sup>22</sup> y la elastina<sup>23</sup>, si bien hay gran variedad de resultados negativos que permiten guiar la investigación: no presenta material amiloide, pues tinciones con rojo Congo y tioflavinas, y los inmunomarcajes contra beta-amiloide, gelsolina (propia de la polineuropatía amiloide tipo IV) y otras proteínas amiloideas dan resultados negativos consistentes<sup>21</sup>. Además, la tinción de plata de Gallyas no muestra presencia de placas ni ovillos, ni se han hallado niveles elevados de proteína tau en líquido cefalorraquídeo (LCR)<sup>24</sup>. Del mismo modo, las tinciones de Von Kossa para calcio, de Perl para el hierro y de Fuelgen para cromatina son negativas, y el espectro de dispersión de microscopía electrónica descarta la presencia de metales o minerales<sup>21</sup>. Las inmunohistoquímicas contra cistatina C, transtiretina, fibrinógeno, catepsina D y alfa-1-antitripsina también son negativas<sup>21</sup>.

A nivel cerebral, se aprecia dilatación del sistema ventricular y ensanchamiento de los espacios perivasculares en los cortes coronales<sup>21</sup>. La sustancia blanca presenta desmielinización parcheada, coloración amarillenta y aumento de consistencia<sup>17,18</sup>. La desmielinización se comprueba con las tinciones Klüver-Barrera y Luxol Fast Blue, y la degeneración axonal con la tinción de Bodian<sup>21</sup>. Las lesiones profundas tienden a ser mayores debido a la menor densidad vascular del tejido<sup>17</sup>. Lesiones similares pueden observarse en el bulbo raquídeo y en la médula espinal<sup>17,18</sup>, raramente en el córtex<sup>25</sup>. En el parénquima se ha observado gliosis por señal difusa de la *glial fibrillary acidic protein* y presencia de astrocitos reactivos para endotelina-1, sin inclusiones de proteína priónica. Por último, se ha observado apoptosis neuronal, que afecta a las capas 3 y 5 del córtex, ricas en neuronas colinérgicas, y se ha comprobado en 2 estudios independientes.

A nivel vascular, las grandes arterias cerebrales muestran cambios menores, aunque en una serie asiática se documentaron estenosis. En las arterias de menor calibre, la tinción con hematoxilina-eosina muestra la destrucción de la capa media arterial, con un menor número de VSMC en evidente proceso de degeneración. En estadios tardíos pueden hallarse solo núcleos rodeados por un halo, comprobado por el marcaje de actina, desmina y miosina. Sin embargo, las células musculares lisas no vasculares presentan morfología normal<sup>17</sup>. Los pericitos y el endotelio también se dañan, como se aprecia en el marcaje contra colágenos III y IV y el transportador de glucosa. Por último, cabe destacar los marcajes contra las chaperonas *heat shock protein 70* (Hsp70) y alfa-beta-cristalina y ubiquitina. La Hsp70 se detecta en las VSMC, aunque no en los GOM, mientras que la alfa-beta-cristalina se halla en el espacio perivascular de las VSMC y extracelular<sup>25</sup>. La concentración de esta última parece correlacionarse con la actividad oxidativa mitocondrial<sup>21</sup> y su morfología es similar a los GOM en las fibras de Rosenthal en la enfermedad de Alexander, pero su localización es intracelular. Por último, en un estudio se observó la rotura de la pared arterial en un 40% de los vasos, acompañada de señal difusa de ubiquitina, sin apreciarse inclusiones en el parénquima ni reactividad en los GOM.

De forma secundaria a la degeneración de la túnica media, es común la duplicación o escisión de la lámina elástica, señalada por las tinciones de elásticas de Weigert (resorcina y fucsina) y de Van Gieson (picrofucsina). Se ha detectado marcaje intenso para los colágenos fibrilares I y III y colágeno VI, pero resultados negativos para colágeno VII, mientras los marcajes de colágeno IV, colágeno V, laminina, vimentina, fibronectina y fibrinógeno varían entre publicaciones. En el caso del colágeno IV, esta variabilidad quizá se explicaría por su acumulación progresiva con la edad. Este engrosamiento intimal progresivo podría conducir, en estadios avanzados, a la estenosis u oclusión de la arteria<sup>26</sup>. También se han observado agregados perivasculares focales de linfocitos o histocitos, en ocasiones asociados con necrosis fibrinoide y

trombos de fibrina y se han detectado mayores niveles de aminooxidasa sensible a semicarbazida, implicada en la infiltración leucocitaria. Los infiltrados son células T CD3<sup>+</sup> y macrófagos activados, que reaccionan con los anticuerpos Ki-M1P, 25F9 y MRP8<sup>18</sup>. Sin embargo, cuando se ha investigado la presencia de inmunoglobulinas A, G, M y E, de cadenas  $\kappa$  y  $\lambda$  y de factores de complemento en los GOM, solo hubo resultados positivos para factores de complemento en muestras incluidas en parafina, quizá fruto de un artefacto<sup>21</sup>.

Por último, a nivel ocular existen anomalías vasculares, con engrosamiento de los vasos, fibrosis perivascular y pérdida de VSMC y pericitos, pero sin obliteración de la luz. El endotelio está desprendido y presenta vacuolas intracelulares y alteraciones mitocondriales. También se detectan mucopolisacáridos en los vasos por la tinción de Hale, y las tinciones de Woeckle y Nissl indican desmielinización y rarefacción del nervio óptico. Aunque la coroides puede estar afectada, solo la retina presenta GOM, que se atribuye al tipo de endotelio, fenestrado en la coroides y continuo en la retina. No hay consenso sobre la correlación entre las lesiones retinales y las de sustancia blanca.

### Etiopatogenia

Existen numerosas teorías para explicar la etiopatogenia de la CADASIL, pero ninguna de ellas se ha contrastado suficientemente. Se ha considerado una enfermedad autoinmunitaria debido al marcaje del GOM con anticuerpos de la vía del complemento junto con su morfología similar con depósitos de inmunoglobulinas, y se ha relacionado con crioglobulinemias, panarteritis nodosa y esclerosis múltiple; hoy aún es frecuente la confusión con esta última. En este sentido, se han descrito enfermos de CADASIL con bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, no se observaron mutaciones en *NOTCH3* en una muestra de familias diagnosticadas de esclerosis múltiple.

Debido al incremento de fibras elásticas en las arterias de enfermos de CADASIL y a la presencia de elastina en los GOM, se postuló que los cúmulos de elastina causarían la enfermedad, similar al pseudoxantoma elástico. Como prueba de la teoría, se describió elastogénesis alterada en fibroblastos de pacientes de CADASIL<sup>23</sup>. En este sentido, la sobreexpresión del ligando autocrino *matrix associated glycoproteins 2* en cultivos de fibroblastos provoca un incremento en el ensamblaje de fibras elásticas. Sin embargo, la elastogénesis no explica la presencia de Notch3 en los GOM ni la degeneración de las VSMC. Además, hay afectación y acumulación de GOM en arteriolas y capilares sin lámina elástica. Así, aunque la sobreproducción de elásticas puede estar implicada en el proceso patogénico, es improbable que constituya la causa primaria de éste.

En la actualidad, aunque el proceso patogénico de CADASIL es desconocido, existen varias evidencias contrastadas. Las mutaciones se producen en el receptor Notch3 y afectan principalmente a residuos de cisteína. Estas provocan la muerte de VSMC y pericitos, que se traduce clínicamente en ictus de repetición y demencia vascular. Así, el proceso patogénico puede dividirse en 3 partes: procesos subcelulares que conducen a la degeneración de VSMC y pericitos (A), procesos supracelulares o de tejido, que explican cómo la muerte de VSMC origina las lesiones neurológicas (B) y causas de la especificidad de las lesiones a nivel neurológico, cuando es una arteriopatía sistémica (C).

### A) Nivel subcelular: de la mutación a la degeneración de células musculares lisas del tejido vascular arterial y de pericitos

En las primeras series clínicas estudiadas se realizaron estudios extensos del músculo y la funcionalidad mitocondrial

sin hallar anomalías<sup>27</sup>, pero con la identificación de varios enfermos con fibras rojo rasgadas se ha propuesto la disfunción mitocondrial como causa de la enfermedad. No obstante, no se ha realizado un estudio molecular suficiente de estos enfermos: a) no

se ha secuenciado el ADN mitocondrial completo; b) se han encontrado mutaciones pero no se ha investigado su patogenicidad (mut. T > C 12957, en el gen *ND5*), o c) la mutación encontrada causa una miopatía pura, y se halla concomitante con

**Tabla 2**  
Modelos celulares para el estudio del receptor Notch3

Estudio	cADN	Tipo celular	Fenotipo		
<b>Funcionalidad de Notch3</b>					
Beatus et al, 1999	Ratón	JEG, HeLa, COS-7	N3ICD ↓ Hes1 y Hes5 inducidos por N1ICD, son antagonistas		
Campos et al, 2002	Ratón	A7r5 y cult. primario de rata	Ang-II y PDGF ↓ N3, Jag1, Hey1 y ↓ glucosilación Jag1, vía MAPK. ↓ crecimiento pero sin frenar en la fase meseta, debido a ↓ p27 <sup>KIP</sup>		
Wang et al, 2002	Ratón	A7r5	N3 da resistencia FasL, por que ↑ c-FLIP vía MAPK e independiente de o CSL. El suero ↑ c FLIP		
Wang et al, 2002	Ratón	A7r5	PDGF ↓ N1, N3 y Hey1, Hey2 vía MAPK. Sinergia entre N1 y N3 para la activación de CSL		
Sweeney et al, 2004	Ratón	R354-05	Hes1, Hes5, Hey1, Hey2 y Hey3 son efectores de N1 y N3. Suero ↑ actividad CSL, N1 y N3 Hey1, Hey2 y Hes5. N1 y N3 ↑ crecimiento, ↓ migración y ↓ apoptosis vía CSL		
Morrow & Sweeney et al, 2005	Ratón	R354-05	Tensión ↓ N1, N3, Jag1, Hes1, Hes5, Hey1, Hey2, Hey3, ↓ crecimiento y ↑ apoptosis vía prot. G y MAPK. N3ICD revierte, parcialmente pues ↑ Hey2, sin revertir Hes5 ni Hey1		
Morrow & Scheller et al, 2005	Ratón	HASMC (CA)	N1ICD y N3ICD ↓ dif. VSMC vía CSL y Hey1, Hey2 y Hey3		
Doi et al, 2006	Ratón	HASMC (KS4001)	N1ICD y N3ICD ↑ smoothelin-B, SM-MHC, h-Cad y SM22α, vía CSL en mesenquimales		
Wang et al, 2007	Humano	HEK293	Idem para N3 cuando se une Jag1; ↑ dif. VSMC en sinergia con miocardina		
Clément et al, 2007	Ratón	Cult. primario de rata	N3ICD ↓ migración, ↑ crecimiento vía N-cadherina y TCF, pero ↓ respuesta Wnt		
Jin et al, 2008	Ratón	C2C12 y 293T	IL1β ↓ N3 vía NF-κB. N3ICD previene ↓ dif VSMC por IL-1β. N1ICD y N3ICD no afectan alfa-actina basal		
Jin et al, 2008	Ratón	C2C12 y 293T	N3ICD y N1ICD ↑ PDGF-Rβ vía CSL. PDGF-BB, a su vez, ↓ N3 y ↓ PDGF-Rβ		
Estudio	Mutación	cADN	Exón	Tipo celular	Fenotipo
<b>Mutación Notch3 humano</b>					
Joutelet et al, 2000	R90C	Humano	3	HEK293, SH-SY5Y	Normal
Low et al, 2006	R90C	Humano	3	HEK293, SH-SY5Y	Normal
Peters et al, 2004	R133C	Humano	4	NIH3T3, A7r5	Procesamiento reducido, corte S1 más lento
Low et al, 2006	R133C	Humano	4	HEK293, SH-SY5Y	Normal
Peters et al, 2004	C183R	Humano	4	NIH3T3, A7r5	Corte S1 más lento
Low et al, 2006	C185R	Humano	4	HEK293, SH-SY5Y	Normal
Joutel et al, 2000	C212S	Humano	4	HEK293, NIH3T3	Normal
Joutel et al, 2004	C428S	Humano	8	HEK293, NIH3T3	Actividad CSL ↓
Low et al, 2006	R449C	Humano	9	HEK293, SH-SY5Y	Normal
Peters et al, 2004	C455R	Humano	9	NIH3T3, A7r5	Actividad CSL ↓, corte S1 más lento
Joutel et al, 2004	C542Y	Humano	11	HEK293, NIH3T3	Localización membrana y actividad CSL ↓
Joutel et al, 2004	R1006C	Humano	19	HEK293, NIH3T3	Normal
Estudio	Mutación	cADN	Exón	Células	Fenotipo
<b>Mutación Notch3 roedor</b>					
Arboleda-Velásquez et al, 2005	R91C	Ratón	3	CHO	Glucosilación por Fringe ↓
Karlstrom et al, 2002	R142C	Ratón	4	HEK293	Localización membrana y corte S1 más lento
Arboleda-Velásquez et al, 2005	R170C	Ratón	4	CHO	Glucosilación por Fringe ↓
Haritunians et al, 2002	R171C	Ratón	4	HEK293	Normal
Haritunians et al, 2002	H184C	Ratón	4	HEK293	Normal
Haritunians et al, 2005	C187R	Rata	4	HEK293	Corte S1 reducido. Actividad CSL por Jag1 ↑, D11 ↓, D14 no varía
Arboleda-Velásquez et al, 2005	C213S	Ratón	4	CHO	Glucosilación por Fringe ↓
Haritunians et al, 2002	C544Y	Ratón	11	HEK293	Normal
Haritunians et al, 2002	R560C	Ratón	11	HEK293	Normal
Estudio	Mutación	Exón	Tipo celular	Fenotipo	
<b>Células de enfermos de CADASIL</b>					
Caronti et al, 1998	No publicado	-	Fibroblastos	↑ elastina (tanto mRNA como proteína)	
Annunen-Rasila et al, 2001	R133C + mtADN 5650G > A	4	Fibroblastos y mioblastos	↓ número mitocondrias, ↓ crecimiento mioblastos, alteración de los filamentos de tubulina	
Ihalainen et al, 2007	R133C	4	VSMC	↓ crecimiento, ↓ vasorreactividad, varía patrón expresión proteico	
Jin et al, 2008	R133C	4	VSMC	PDGF-Rβ	
Formichi et al, 2009	9 mutaciones	Varios	Fibroblastos y linfocitos	↑ apoptosis por tratamiento con 2-desoxi-D-ribosa	

↓: provoca la disminución; ↑: provoca un aumento; 293T: HEK293 con el antígeno T de SV40; A7r5: *rat aorta thoracic smooth muscle cells*; ADN: ácido desoxirribonucleico; Ang-II: angiotensina II; ARN: ácido ribonucleico; -BB: isoforma BB; C2C12: línea celular de mioblastoma de ratón; CA: *cell applications* (San Diego); CADASIL: arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía; cADN: ADN complementario; c-FLIP: *cellular FLICE inhibitory protein*; CHO: línea celular de ovario de hámster chino; COS-7: línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano transfectadas con SV40; corte S1: primer corte proteolítico del receptor Notch por O-furina; CSL: CBF-1/Su(H)/Lag-1; D11: delta1; D14: delta4; FasL: fas ligando; HASMC: *human aortic smooth muscle cells*; h-Cad: *h-caldesmon*; HEK293: *human embryonic kidney 293 cells*; HeLa: Henrietta Lacks (células de cuello de útero); Hes: *hairly and enhancer of split*; Hey: *Hairy/E(spl)-related with YRPW motif*; IL-1β: interleuquina 1β; Jag1: *jagged1*; JEG: *human placental choriocarcinoma cell line*; KS: Kurabo Industries (Osaka); mRNA: ARN mensajero; MAPK: *mitogen associated protein kinase*; mtADN: ADN mitocondrial; N1:Notch1; N3: Notch3; N1ICD: dominio intracelular N1; N3ICD: dominio intracelular de N3; NF-κB: *nuclear factor kappaB*; NIH3T3: línea celular de fibroblastos (origen embrionario de ratón suizo); p27<sup>KIP</sup>: *cyclin-dependent kinase inhibitor p27*; PDGF: factor de crecimiento plaquetar; PDGF-Rβ: receptor beta del factor de crecimiento plaquetar; prot.G: proteína G; R354-05: *rat aortic smooth muscle cells*; SH-SY5Y: línea celular humana de neuroblastoma; SM-MHC: *smooth muscle myosin heavy chain*; TCF: *T-cell factor*; VSMC: células musculares lisas vasculares.

CADASIL por azar. En apoyo de la disfunción mitocondrial, se ha observado que los enfermos de CADASIL tienen una tasa mayor de variaciones en el ADN mitocondrial y se detectaron disfunciones en la cadena de fosforilación oxidativa de un modelo de mosca<sup>3</sup>. No obstante, este modelo presenta limitaciones importantes.

Otros autores han propuesto que la glucosilación por Fringe podría ser la causa de la enfermedad, pues se demostró en un modelo *in vitro* que el patrón de N-glucosilación se alteraba incluso por mutaciones lejanas al residuo glucosilado (p. ej. R91C)<sup>14</sup>. Ahora bien, el uso de mutaciones murinas ortólogas en CADASIL es poco válido, pues un ratón transgénico generado por la mutación R142C murina no presentaba los signos propios de CADASIL<sup>5</sup>.

Así, las 2 teorías principales que pretenden explicar el mecanismo molecular de CADASIL son la pérdida de función del receptor y la ganancia de una nueva función deletérea<sup>28,29</sup>. La primera hipótesis establece que las mutaciones del *NOTCH3* causarían una disfunción en el receptor y se verían alteradas las vías metabólicas en las que participa. Este modelo es homólogo a enfermedades como la de Fabry, provocadas por una disfuncionalidad en la enzima alfa-galactosidasa, y que presentan episodios icterales recurrentes. En general, la pérdida de función puede deberse a un fenómeno de haploinsuficiencia (un alelo funcional no es suficiente) o a un efecto negativo dominante (el alelo/receptor mutado impide que el alelo/receptor sano funcione). En el caso de CADASIL, únicamente sería válido un efecto negativo dominante, pues el fenotipo de los pacientes homocigotos no difiere significativamente de sus familiares heterocigotos<sup>30,31</sup>, cuando en un fenómeno de haploinsuficiencia el fenotipo del paciente homocigoto debería ser mucho más grave. Además, la construcción de los ratones transgénicos R90C y C428S confirma este aspecto, pues al introducir el gen humano con estas mutaciones y mantener los 2 genes murinos se observa degeneración de las VSMC y acumulación de GOM<sup>4,6</sup>. La teoría de pérdida de función se fundamenta en los problemas de procesamiento o funcionalidad provocados por diversas mutaciones en cultivos celulares (tabla 2), la implicación de Notch3 en la regulación del tono miogénico y vías antiapoptóticas, el menor incremento de *platelet derived growth factor receptor beta* en respuesta a la activación de Notch3 en VSMC de enfermos de CADASIL<sup>32</sup> y la mayor sensibilidad de sus fibroblastos y linfocitos al estrés oxidativo<sup>33</sup>.

En cuanto a la teoría de ganancia de función, se desconoce la función deletérea adquirida, aunque se han propuesto la agregación tóxica en forma de GOM y la activación prolongada de la *unfolded protein response* (UPR, 'respuesta al mal plegamiento proteico')<sup>29</sup>. La toxicidad de los agregados se asemejaría a las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, con el cúmulo de péptido beta-amiloide y proteína tau o alfa-sinucleína. Este modelo se fundamenta en la acumulación de Notch3 en los GOM<sup>22</sup> y la agrupación de las mutaciones de segmentos poco conservados que evolutivamente no son esenciales para su funcionamiento<sup>34</sup>.

Desafortunadamente, las observaciones en los modelos transgénicos murinos van en contra tanto de la pérdida de función como de la toxicidad de los GOM<sup>4,6</sup>. Se ha observado degeneración de la túnica media vascular antes del cúmulo de GOM en el tejido arterial, lo que descarta la toxicidad de los GOM porque la muerte celular se produce antes de que se produzcan los cúmulos. Por otro lado, el gen humano con la mutación R90C mantiene su expresión y actividad en ratones KO<sup>35</sup>, lo que descartaría la pérdida de función. Además, no se ha observado apoptosis en las arteriolas del ratón KO y el tono miogénico de las arterias cerebrales del ratón R90C se incrementa, mientras que en el ratón KO se reduce<sup>7,10</sup>, y cuando se ha estudiado la función del receptor

*in vitro*, numerosas mutaciones mantienen los niveles de expresión y funcionalidad de la vía clásica de activación<sup>36</sup> (tabla 2). Incluso se ha asociado la pérdida de función del receptor con una evolución más lenta de la enfermedad<sup>6</sup>.

Dentro de la ganancia de función, la apoptosis de las VSMC también podría estar provocada por una activación prolongada de la UPR<sup>29</sup>, como se ha propuesto en diabetes o esclerosis lateral amiotrófica. Este modelo relacionó por primera vez las mutaciones del receptor Notch3 con la aparición de GOM y la apoptosis de las VSMC. Este mecanismo se basa en un estudio de proteómica con geles 2D, en el que se comparó un cultivo de cordón umbilical de un neonato con CADASIL frente a 5 controles sanos. De las 35 proteínas alteradas, se seleccionaron 11 para la elaboración del modelo (fig. 3). Según este modelo, las mutaciones de Notch3 provocarían el estrés del retículo endoplasmático rugoso, que entraría en un ciclo de oxidación-reducción de los puentes bisulfuro del receptor mutado y la consecuentemente activación de la UPR. El estrés del retículo endoplasmático rugoso generaría especies reactivas de oxígeno y causaría disfunción mitocondrial, la entrada en apoptosis de la célula y una potente activación del proteosoma. De forma paralela, alteraciones en la polimerización de microtúbulos y filamentos de actina darían lugar a las alteraciones microestructurales observadas en las VSMC. Este modelo presenta diversas limitaciones: a nivel teórico, no se establece una cadena causal entre las mutaciones de Notch3 y los niveles de 6 de las 11 proteínas, entre ellas la que explicaría la aparición de los GOM (ubiquitil carboxil esterasa L1), ni se mencionan las otras 24 proteínas alteradas significativamente. A nivel técnico, no se replicaron los resultados por *western blot* ni se estudiaron las vías de activación clásicas de la UPR y, por último, los resultados se obtuvieron de la comparación de un único caso de CADASIL frente a 5 controles. A pesar de las limitaciones, este modelo es el que mejor se aproxima a las alteraciones observadas. La presencia de las chaperonas alfa-beta-cristalina y Hsp70 en las VSMC de pacientes con CADASIL<sup>25</sup> y la inhibición del proteosoma por parte del péptido señal de Notch3<sup>37</sup> podrían interpretarse como indicios independientes de este mecanismo.

## B) Nivel tejido: de la degeneración celular a la sintomatología neurológica

Siguiendo con el modelo de UPR, la reactividad de las VSMC se reduciría por disfunción del sistema renina-angiotensina (fig. 2), que explicaría el tono miogénico exacerbado. Este fenómeno vendría acompañado, además, por una baja capacidad proliferativa y un estado celular proapoptótico<sup>29</sup> que, con las lesiones propias de la edad (pérdida de VSMC y pericitos y tortuosidad creciente de las arterias penetrantes) empeoraría hasta hacerse detectable *in vivo*, como se ha observado tanto en el modelo murino como en pacientes. Con el progreso de la enfermedad se pierde cualquier tipo de vasorreactividad, y queda la circulación cerebral a merced de la presión arterial sistémica<sup>38</sup>. Como respuesta adaptativa, disminuye la presión arterial y sus oscilaciones circadianas y se produce el engrosamiento de la adventicia y la íntima (observado también en aterosclerosis y con el envejecimiento) para reforzar la pared arterial y evitar la aparición de hemorragias, aunque la presencia de microhemorragias y la elevada tasa de hemorragias en población asiática<sup>39,40</sup> deja esta faceta protectora en entredicho. El mantenimiento de la función endotelial también es dudoso, pero es seguro que se produce apoptosis endotelial<sup>41</sup>. La vasorreactividad cerebral alterada conduciría a un estado de oligoemia, reducción del consumo metabólico y de la producción de neurotransmisores, como se ha observado por tomografía de emisión de protones y

espectroscopia por resonancia magnética. La sustancia blanca profunda, irrigada por arterias de pequeño calibre y sin circulación colateral adecuada, sería la zona más afectada por este estado: se ensancharían los espacios perivasculares y daría lugar a una grave leucoaraiosis<sup>42,43</sup> (fig. 3).

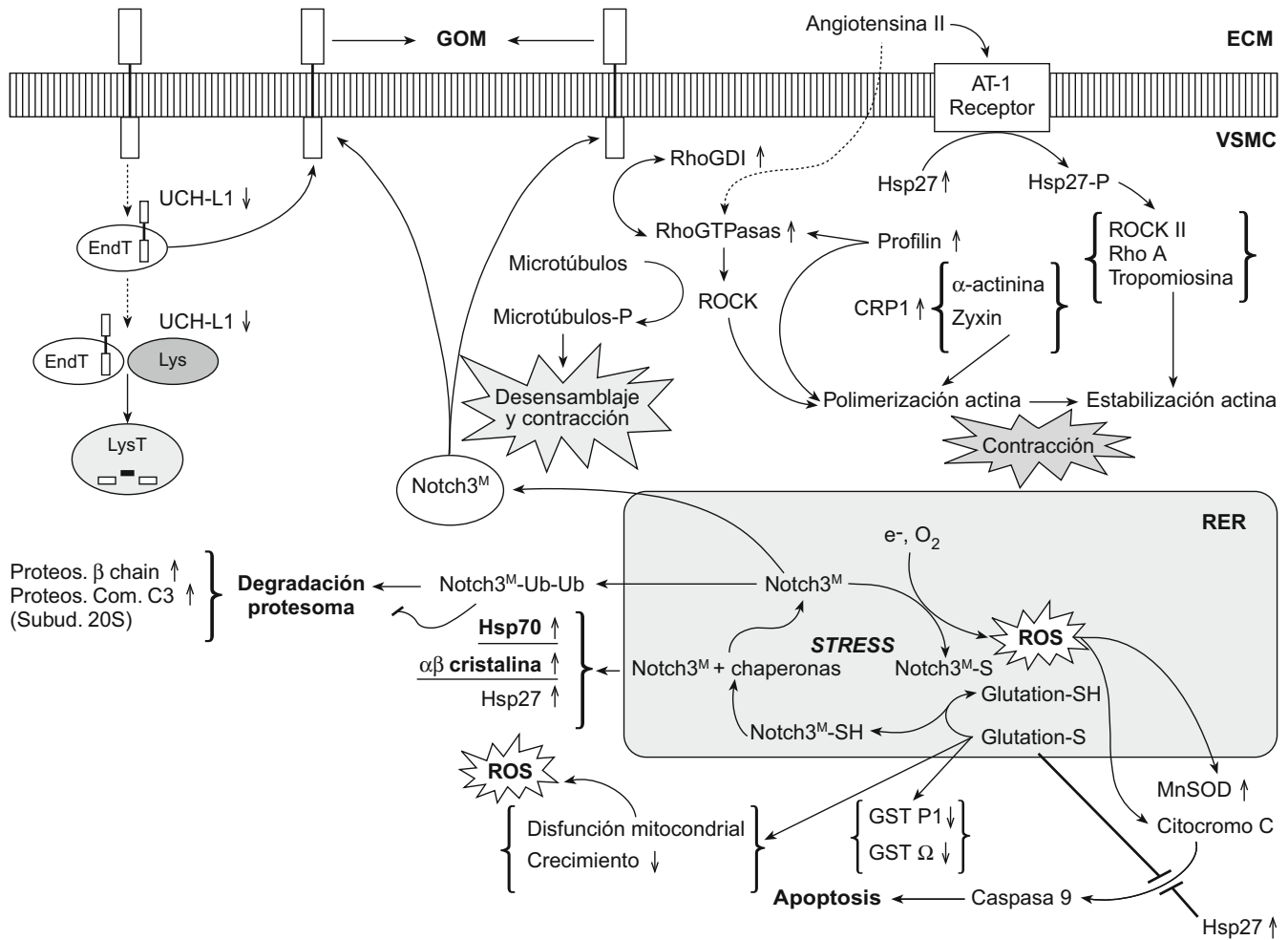
Existen 2 hipótesis para la aparición de las lesiones isquémicas: 1) el estrechamiento de los vasos debido al cúmulo de GOM y componentes de la MEC<sup>26</sup> y 2) una vasorreactividad deficiente<sup>44</sup>. Con el progreso de la enfermedad, se produciría la muerte de neuronas colinérgicas por toxicidad retrógrada axonal, lo que se relaciona con la presencia de infartos lacunares. No en vano existe una correlación entre los ictus lacunares y las escalas de deterioro cognitivo, aunque las lesiones isquémicas no tendrían inicialmente repercusión funcional por la reorganización del córtex motor. Se desconoce el orden en que se afectan las diversas regiones cerebrales, pero podrían explicar los trastornos del ánimo<sup>27</sup>, trastornos motores<sup>45</sup>, disejecutivos<sup>46</sup> y deterioro cognitivo. Resta por aclarar el origen de los ataques epilépticos y la migraña con aura, que aparecen con anterioridad a la isquemia. La PID<sup>47</sup> podría ser el vínculo entre ambos procesos y el ictus, como resultado de una misma disfunción pero con lindares de acción distintos. En este sentido, la migraña se manifiesta en la fase inicial de la enfermedad, los ictus se acompañan de migraña y Notch3 influye en la tasa de PID<sup>14</sup>.

**C) Nivel organismo: causas de la especificidad de las lesiones a nivel neurológico**

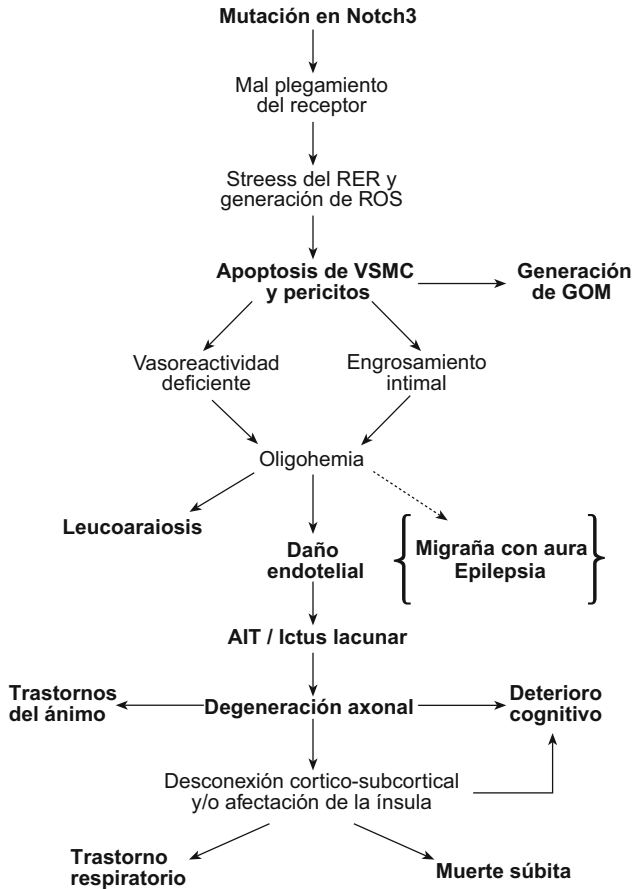
Existen varias explicaciones por las que la sintomatología de CADASIL es exclusivamente neurológica, aunque sea una arteriopatía sistémica, que podrían coexistir:

1. La particular morfología cerebrovascular, con la presencia de barrera hematoencefálica<sup>48</sup> y la menor proporción de adventicia y VSMC en los vasos cerebrales respecto a las arterias extracraneales<sup>49</sup>.
2. La limitada capacidad regenerativa neuronal en edad adulta.
3. Las elevadas necesidades metabólicas del encéfalo, pues consume hasta un 20% de la energía corporal (es el órgano más sensible a la isquemia y al déficit de glucosa).
4. La función variable de las arterias según su diámetro y localización. En ratones KO y CADASIL, la vasorreactividad cerebral estaba alterada mientras las grandes arterias no mostraban cambios.

Se ha postulado que la falta de VSMC disminuiría drásticamente la producción del *vascular endothelial growth factor* y, en consecuencia, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica<sup>48</sup>.



**Figura 2.** Modelo para el proceso desencadenante de la apoptosis de células musculares lisas vasculares basado en la activación prolongada de la respuesta al mal plegamiento proteico. -P: fosforilación; -SH: reducción de un puente disulfuro a sulfhidrilos; -Ub: ubiquitinación; ↑: incremento; ↓: decremento; AT1: angiotensina 1; Comp.: componente; CRP1: Cystein Rich Protein 1; ECM: matriz extracelular; End: endosoma; GOM: material granular osmiófilo; GST: glutatión S-transferasa; Hsp: heat shock protein; Lys: Lisosoma; MnSOD: manganeso superóxido dismutasa; Notch3<sup>M</sup>: Notch3 mutado; Proteos: proteosoma; ROCK: rho quinasa; ROS: especies reactivas de oxígeno; T: tardío; UCH-L1: ubiquitil carboxil hidroxilasa L1.



**Figura 3.** Modelo propuesto para el mecanismo patogénico. En negro se indican fenómenos contrastados, en gris las hipótesis basadas en resultados experimentales. AIT: accidente isquémico transitorio; GOM: material granular osmiófilo; RER: retículo endoplasmático rugoso; ROS: especies reactivas de oxígeno; VSMC: célula muscular lisa vascular.

El agente permeabilizador alternativo, la histamina, sería insuficiente y la producción del *vascular endothelial growth factor* parece reducirse con la edad. Sin embargo, neutrófilos activados, macrófagos, astrocitos y, en condiciones hipóxicas, incluso el endotelio también pueden secretar este factor.

Por otro lado, se desconoce la causa del gran número de muertes súbitas en estados terminales<sup>50</sup>; podría estar relacionada con la elevada tasa de arritmias de estos pacientes, cuya causa podría ser una desconexión cortical-subcortical, lesiones en la ínsula o en la protuberancia o una verdadera afección cardíaca. La explicación más plausible parece ser una muerte súbita de origen central, mediada probablemente por la ínsula, como se ha observado en numerosos modelos animales de ictus y en diversas series clínicas, pues no se han hallado deficiencias en el funcionamiento cardíaco en CADASIL.

## Conclusiones

La sintomatología de los pacientes con CADASIL es ampliamente conocida<sup>27</sup> y mediante análisis de ligamiento se determinó hace más de una década el gen causante de la arteriopatía<sup>1</sup>. Es sabido que las mutaciones de *NOTCH3* provocan la muerte de VSMC y de pericitos y que este hecho se traduce en los síntomas clínicos, pero no la forma en que estos fenómenos se relacionan. De las hipótesis referidas a nivel subcelular, la activación prolongada de la señal UPR<sup>29</sup> parece ser

la más plausible, pero no está contrastada. En cuanto a la causa de las lesiones isquémicas, vasoreactividad deficiente y reducción de la luz del vaso podrían coexistir, y la localización o volumen de las lesiones originaría la clínica resultante, a excepción de la migraña con aura y la epilepsia, en las que podría intervenir la PID. La elucidación del mecanismo causante de la enfermedad permitirá la identificación de dianas terapéuticas y el tratamiento efectivo del CADASIL, basado hasta ahora exclusivamente en el alivio de la sintomatología.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Deseamos agradecer a todos los colaboradores del grupo de estudio de CADASIL: I. Fernández-Cadenas, M. Mendióroz, P. Bassas, B. Ferrer, S. Domingues-Montanari, J. Fernández-Morales y V. García-Patos.

## Bibliografía

- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*. 1996;383:707-10.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand RJ, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284:770-6.
- 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.
- 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.
- Lundkvist J, Zhu S, Hansson EM, Schweinhardt P, Miao Q, Beatus P, et al. Mice carrying a R142C Notch 3 knock-in mutation do not develop a CADASIL-like phenotype. *Genesis*. 2005;41:13-22.
- 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;132:1601-12.
- Arboleda-Velásquez JF, Zhou Z, Shin HK, Louvi A, Kim HH, Savitz SI, et al. Linking Notch signaling to ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:4856-61.
- Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, et al. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev*. 2004;18:2730-5.
- Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev*. 2001;108:161-4.
- Belin de Chantemele EJ, Retailliau K, Pinaud F, Vessieres E, Bocquet A, Guihot AL, et al. Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:2216-24.
- Baron M, Aslam H, Flasz M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrt SL, et al. Multiple levels of Notch signal regulation. *Mol Membr Biol*. 2002;19:27-38.
- Dziewulska 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.
- Dichgans M, Ludwig H, Muller-Hocker J, Messerschmidt A, Gasser T. 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.
- Arboleda-Velásquez JF, Rampal R, Fung E, Darland DC, Liu M, Martínez MC, et al. CADASIL mutations impair Notch3 glycosylation by Fringe. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1631-9.
- D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene*. 2008;27:5148-67.
- Meng H, Zhang X, Hankenson KD, Wang MM. Thrombospondin2 potentiates notch3/Jagged1 signaling. *J Biol Chem*. 2009;284(12):7866-74.
- Ruchoux MM, Gueroaou D, Vandenhaute B, Pruvo JP, Vermersch P, Leys D. Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol*. 1995;89:500-12.
- Bergmann M, Ebke M, Yuan Y, Brück W, Mugler M, Schwendemann G. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL): A morphological study of a German family. *Acta Neuropathol*. 1996;92:341-50.
- Brulin-Fardoux P, Godfrain C, Mauraige CA, De RJ, Hauw JJ, Kaltner H, et al. Glycohistochemical characterization of vascular muscle cell destruction in



- CADASIL subjects by lectins, neoglycoconjugates and galectin-specific antibodies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003;29:400–10.
20. Lesnik Oberstein SA, Maat-Schieman ML, Boon EM, Haan J, Breuning MH, Van Duinen SG. No vessel wall abnormalities in a human foetus with a NOTCH3 mutation. *Acta Neuropathol.* 2008;115:369–70.
  21. LaPoint SF, Patel U, Rubio A. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Adv Anat Pathol.* 2000;7:307–21.
  22. Ishiko A, Shimizu A, Nagata E, Takahashi K, Tabira T, Suzuki N, et al. Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol (Berl).* 2006;112:333–9.
  23. Caronti B, Calandriello L, Francia A, Scorretti L, Manfredi M, Sansolini T, et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). Neuro pathological and in vitro studies of abnormal elastogenesis. *Acta Neurol Scand.* 1998;98:259–67.
  24. Formichi P, Parnetti L, Radi E, Cevenini G, Dotti MT, Federico A. CSF levels of beta-amyloid 1–42, tau and phosphorylated tau protein in CADASIL. *Eur J Neurol.* 2008;15:1252–5.
  25. Rubio A, Rifkin D, Powers JM, Patel U, Stewart J, Faust P, et al. Phenotypic variability of CADASIL and novel morphologic findings. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997;94:247–54.
  26. Miao Q, Paloneva T, Tuominen S, Poyhonen M, Tuisku S, Viitanen M, et al. Fibrosis and stenosis of the long penetrating cerebral arteries: The cause of the white matter pathology in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Brain Pathol.* 2004;14:358–64.
  27. 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.
  28. Spinner NB. CADASIL: Notch signaling defect or protein accumulation problem? *J Clin Invest.* 2000;105:561–2.
  29. Ihalainen S, Soliymani R, Iivanainen E, Mykkanen K, Sainio A, Poyhonen M, et al. Proteome analysis of cultivated vascular smooth muscle cells from a CADASIL patient. *Mol Med.* 2007;13:305–14.
  30. 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.
  31. Liem MK, Lesnik Oberstein SA, Vollebregt MJ, Middelkoop HA, Van der Grond J, Helderman-Van den Enden AT. Homozygosity for a NOTCH3 mutation in a 65-year-old CADASIL patient with mild symptoms: A family report. *J Neurol.* 2008;255:1978–80.
  32. Jin S, Hansson EM, Tikka S, Lanner F, Sahlgren C, Farnebo F, et al. Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2008;102:1483–91.
  33. Formichi P, Radi E, Battisti C, Di Maio G, Tarquini E, Leonini A, et al. Apoptosis in CADASIL: An in vitro study of lymphocytes and fibroblasts from a cohort of Italian patients. *J Cell Physiol.* 2009;219:494–502.
  34. Donahue CP, Kosik KS. Distribution pattern of Notch3 mutations suggests a gain-of-function mechanism for CADASIL. *Genomics.* 2004;83:59–65.
  35. 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.
  36. Wang T, Baron M, Trump D. An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;96:499–509.
  37. Zhang Y, Jia L, Lee SJ, Wang MM. Conserved signal peptide of Notch3 inhibits interaction with proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355:245–51.
  38. 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 reconstruction of serial sections of an autopsy case. *Stroke.* 2002;33:2565–9.
  39. Choi JC, Kang SY, Kang JH, Park JK. Intracerebral hemorrhages in CADASIL. *Neurology.* 2006;67:2042–4.
  40. Lee YC, Liu CS, Chang MH, Lin KP, Fuh JL, Lu YC, et al. Population-specific spectrum of NOTCH3 mutations, MRI features and founder effect of CADASIL in Chinese. *J Neurol.* 2009;256:249–55.
  41. Ruchoux MM, Maurage CA. Endothelial changes in muscle and skin biopsies in patients with CADASIL. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24:60–5.
  42. Liem MK, Lesnik Oberstein SA, Haan J, Boom RV, Ferrari MD, Buchem MA, et al. Cerebrovascular reactivity is a main determinant of white matter hyperintensity progression in CADASIL. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30:1244–1247.
  43. Cumurciuc R, Guichard JP, Reizine D, Gray F, Bousser MG, Chabriat H. Dilation of Virchow-Robin spaces in CADASIL. *Eur J Neurol.* 2006;13:187–90.
  44. Ruchoux MM, Brulin P, Leteurtre E, Maurage CA. Skin biopsy value and leukoaraiosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;903:285–92.
  45. Reddy H, De Stefano N, Mortilla M, Federico A, Matthews PM. Functional reorganization of motor cortex increases with greater axonal injury from CADASIL. *Stroke.* 2002;33:502–8.
  46. Royall DR. Measurement of meaningful treatment effects in CADASIL. *Lancet Neurol.* 2008;7:673–4.
  47. Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, et al. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke.* 2002;33:2738–43.
  48. Ruchoux MM, Brulin P, Brillault J, Dehouck MP, Cecchelli R, Bataillard M. Lessons from CADASIL. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;977:224–31.
  49. Rafalowska J, Dzielwulska D, Fidzianska A. CADASIL: What component of the vessel wall is really a target for Notch 3 gene mutations? *Neurol Res.* 2004;26:558–62.
  50. Opherck C, Peters N, Herzog J, Luedtke R, Dichgans M. Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: A retrospective study in 411 patients. *Brain.* 2004;127:2533–9.