

RASSEGNA

CADASIL: UNA MALATTIA NEUROLOGICA SOTTOSTIMATA

CADASIL: an underestimated neurological disorder

GIOVANNI SAVETTIERI¹, AURELIA BANCO², ROSALUCIA MAZZEI³

¹Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche, Università degli Studi di Palermo;

²Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Palermo;

³Istituto di Scienze Neurologiche, CNR, Mangone, Cosenza

SUMMARY

CADASIL is the most common single-gene disease with autosomal dominant transmission causing damage of the small blood vessels of the brain leading to a subcortical cerebrovascular disease. The disorder is due to a mutation in the Notch3 gene. The product of NOTCH3 gene is a membrane protein that has an essential role in the processes of differentiation and maturation of muscle cells of vessels. The frequency of the disease is unknown, but greatly underestimated. CADASIL, from a clinically point of view, is characterized by the presence of migraine with aura, recurrent stroke, dementia and psychiatric disorders. The natural history of the disease is very variable even within the same family. Neuroimaging techniques are an indispensable diagnostic tool. The diagnostic confirmation is obtained by skin biopsy and molecular genetic analysis. Currently no treatments for the disease are available.

Keywords: *Ischemic stroke, migraine, dementia, small vessel disease.*

CADASIL è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante dovuta alla mutazione del gene NOTCH3, localizzato sul cromosoma 19. Si tratta di una microangiopatia cerebrale sottocorticale con leucoencefalopatia, che coinvolge primariamente le arterie leptomeningee e perforanti lunghe dell'encefalo. Si manife-

sta con episodi ictali ricorrenti, emicrania, disturbi psichiatrici e demenza.

Note storiche

CADASIL è l'acronimo di "Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy". Il termine fu coniato da Elizabeth Tournier-Lasserre nel 1993 che lo propose in un articolo in cui veniva identificato il cromosoma contenente il gene causa della malattia (1). Già prima dell'identificazione genetica della malattia, in realtà, erano stati pubblicati parecchi articoli che riporta-

Indirizzo per la corrispondenza

Giovanni Savettieri
Dipartimento di Biomedicina Sperimentale
e Neuroscienze Cliniche
Università degli Studi di Palermo
Via del Vespro, 143 - Palermo
E-mail: giovanni.savettieri@unipa.it

vano casi familiari di patologie con fenotipi clinici suggestivi di quella condizione che fu poi definita CADASIL. In particolare, nel 1955 Ludo van Bogaert aveva descritto il caso di due sorelle affette da un'encefalopatia vascolare sottocorticale, tipo malattia di Binswanger, a rapido decorso (2); nel 1977, Sourander e Walinder riportavano il caso di una famiglia svedese in cui una forma di encefalopatia multiinfartuale, con andamento remittente, che coinvolgeva vari distretti cerebrali e determinava declino cognitivo, si trasmetteva con modalità autosomica dominante (3). Ancora, nello stesso anno, veniva descritta una famiglia inglese affetta da una encefalopatia vascolare cronica familiare (4). I casi riguardanti la famiglia svedese e quella inglese sono stati, in anni successivi, oggetto di uno studio approfondito, sia genetico che clinico, neuroradiologico, e neuropatologico. Questo studio rivelò come solo la famiglia inglese era, in realtà, affetta da CADASIL (5). Nel 1996 Anne Joutel, dopo che il cromosoma sede del gene mutato era stato identificato, individuava una mutazione del gene NOTCH3 - chr19p13 (6).

Epidemiologia

Le informazioni che possono derivare da studi epidemiologici di malattie rare sono molto limitate. Laddove si tratti di malattie genetiche, come nel caso di CADASIL, i dati epidemiologici possono essere di qualche utilità nello stabilire eventualmente se vi siano etnie in cui la frequenza di malattia sia particolarmente elevata o se vi sia un'interazione genoma-ambiente nel determinismo della malattia. La rarità della malattia tuttavia non permette di stabilire tassi affidabili e quindi di stimare la frequenza di malattia in popolazioni diverse in aree geografiche diverse. Inoltre si può supporre che i tassi di frequenza

siano generalmente sottostimati sia per le difficoltà diagnostiche, sia per l'incompletezza dello screening del gene NOTCH3, sia anche per la scelta del campione di popolazione a rischio.

Uno studio descrittivo, portato a termine in due distretti sanitari della Scozia occidentale (Greater Glasgow e Lanarkshire), ha riportato una prevalenza minima della malattia di 1,98 casi per 100.000 abitanti ed una frequenza di mutazione nel gene NOTCH3, stimata individuando anche i portatori sani della mutazione, di 4,14 per 100.000 abitanti (7). Lo studio è basato su un registro nazionale e i criteri diagnostici includono la diagnosi genetica-molecolare, anche se limitata all'analisi degli esoni 3, 4, 5 e 6 del gene NOTCH3. In uno studio su 218 pazienti affetti da stroke lacunare, Dong et al. (2003) hanno analizzato la frequenza della mutazione osservando un tasso molto basso: la mutazione fu rinvenuta in un solo paziente. Anche in questo studio gli esoni di NOTCH3 analizzati furono il 3, 4, 5 e 6 (8). Uno studio di recente pubblicazione ha indagato il gene NOTCH3 in una coorte di pazienti di età inferiore a 70 anni, affetti da stroke lacunare. Nonostante il campione in studio fosse di non piccole dimensioni, solo 5 pazienti su 994 presentavano una mutazione nel gene con un tasso di prevalenza quindi di 0,5% (9).

Sono stati pubblicati parecchi altri studi che hanno analizzato la frequenza della mutazione in serie cliniche selezionate, che hanno dato risultati variabili. Tuttavia, in questi studi la dimensione dei campioni, la metodologia d'indagine, i criteri di selezione dei casi, il numero degli esoni analizzato è estremamente variabile tanto da non permettere un paragone tra le varie indagini.

In popolazioni con background genetico limitato sono state osservate frequenze particolarmente elevate: in Finlandia 4 casi

per 100.000 abitanti (10) e nell'isola Gran Canaria 14 casi per 100.000 (riportato da Tikka et al. (2014) (11). Di particolare interesse sono i dati ottenuti da uno studio italiano condotto su 28 famiglie non imparentate. Lo studio ha analizzato gli esoni di NOTCH3 da 2 a 28 osservando che l'esone 11 era quello più frequentemente sede della mutazione (21%) seguito dall'esone 4 (18%). Il risultato contrasta con l'idea, comunemente consolidata, che gli esoni 3 e 4 siano quelli più frequentemente sede di mutazione. Il dato è a sostegno di una variabilità della mutazione legata probabilmente all'origine delle famiglie (12). La malattia è stata riscontrata in parecchi paesi di pressoché tutti i continenti.

Caratteristiche Cliniche

Il quadro clinico di CADASIL è molto variabile, anche nell'ambito della stessa famiglia, anche in presenza della medesima mutazione (10, 13). Si possono considerare alcune manifestazioni più frequentemente osservabili e alcune altre meno frequenti.

Ictus cerebrale ischemico e Attacco ischemico transitorio. L'ictus cerebrale ricorrente è l'evento clinico più comune potendosi osservare in oltre l'85% dei pazienti affetti da CADASIL. Gli infarti cerebrali ischemici possono essere preceduti da eventi ischemici transitori (TIA) che, non infrequentemente, risultano indistinguibili dalle aeree emicraniche, altro sintomo frequente in questa malattia. L'età in cui il primo ictus si manifesta, è molto variabile. L'età media d'insorgenza si colloca tra i 40 e i 50 anni (13-15). Gli episodi ischemici sono prevalentemente sottocorticali realizzando una condizione di encefalopatia lacunare che può evolvere in una sindrome pseudobulbare. Gli eventi ischemici possono determinare danni del si-

stema motorio (emiparesi piramidale), del sistema sensitivo (ictus sensitivo) o realizzare una sindrome atassica per infarto cerebellare. Il tasso d'incidenza medio dell'ictus, calcolato in una serie clinica di 80 pazienti, è stato stimato in 10.4 casi per 100 persone-anno (16). I fattori di rischio vascolari non sono in genere associati a CADASIL, anche se uno studio inglese, su 200 pazienti consecutivi, ha rilevato un aumento di rischio di ictus negli ipertesi (odds ratio 2,57) e nei fumatori (odds ratio 1,07) (17). L'evenienza di ictus emorragico è molto rara. Sono stati riportati solo pochi casi e, peraltro, alcuni di questi pazienti erano trattati con anticoagulanti o erano affetti da ipertensione (si veda a proposito l'articolo di Lian et al. che propone un'interessante tabella riguardante i 21 casi di stroke emorragico in corso di CADASIL) (18). In una serie consecutiva di pazienti coreani affetti da CADASIL la frequenza di emorragie cerebrali era del 25% (19). Questa osservazione ripropone la variabilità del quadro della malattia in rapporto alla popolazione studiata.

Emicrania. L'emicrania rappresenta il sintomo d'esordio più frequente e si manifesta in età giovanile, intorno a 20 anni. L'esordio dell'emicrania spesso coincide con la comparsa delle alterazioni neuroradiologiche presenti nei pazienti affetti da CADASIL. Le persone affette da emicrania primaria presentano, in una percentuale non trascurabile di casi, alterazioni puntiformi e iperintense della sostanza bianca, osservabili in risonanza magnetica, utilizzando sequenze T2 o FLAIR. Queste alterazioni non sono dissimili da quelle osservabili nei pazienti con CADASIL in esordio proponendo quindi un problema di diagnostica differenziale di importanza non trascurabile.

L'attacco cefalalgico, in corso di CADASIL, è preceduto, con una frequenza elevata, da aura. Questa può essere un'aura

tipica (visiva, sensitiva, afasica), atipica o anche *sine emicrania*. In uno studio di revisione sulle caratteristiche della cefalea nei pazienti affetti da CADASIL, Sacco et al. (2010) hanno osservato come il sintomo cefalea era presente nel 51,7% dei pazienti, di questi il 92% era affetto da emicrania; l'emicrania con aura era presente nel 35% dei casi, il 2% soffriva di emicrania senza aura, il 43% di emicrania non specificata e il 19,1% di più di un tipo di emicrania (20). Altri autori hanno riportato casi di emicrania basilare, emicrania emiplegica familiare (21) e di *status emicranicus* (22).

Declino cognitivo e Demenza. Il declino cognitivo, che il più delle volte evolve in demenza, rappresenta il secondo più frequente disturbo in corso di CADASIL, raggiungendo frequenze di oltre il 60%. Il disturbo può iniziare in maniera subdola con un coinvolgimento delle funzioni esecutive individuabile attraverso test specifici (23). Il declino cognitivo aumenta con l'aumentare dell'età (15) coinvolgendo nel tempo, progressivamente, memoria, attenzione, abilità manuali, linguaggio, capacità di astrazione e ragionamento (24). Buffon et al. (2006) hanno dimostrato come il pattern delle disfunzioni cognitive è eterogeneo nella fase iniziale di malattia, mentre diviene omogeneo dopo i 60 anni coinvolgendo tutti i domini cognitivi (24). La progressione verso la demenza non è associata soltanto all'età, ma è anche strettamente correlata alla frequenza degli episodi ictali ricorrenti. In buona sostanza, ciò che si viene a realizzare è una forma di demenza vascolare sottocorticale.

Disturbi Psichiatrici. La patologia psichiatrica si riscontra in circa il 30% dei pazienti affetti da CADASIL. La condizione psicopatologica più frequente è rappresentata dai disturbi dell'umore (25), ma si posso-

no rilevare anche disturbi da conversione, disturbo d'ansia e disturbi di personalità. Il disturbo depressivo del CADASIL si potrebbe correlare con quella patologia dell'umore definita come "post-stroke depression", patologia per la quale si è ipotizzata un'alterazione del metabolismo della serotonina secondaria al danno assonale e all'attività delle citochine (26). Altre manifestazioni psichiatriche includono condizioni psicotiche e disturbi del comportamento con dipendenze. Il più spesso le manifestazioni psichiatriche hanno il loro debutto in fase d'esordio della malattia e possono essere transitorie per poi ripresentarsi in età più avanzata. Un sospetto più consistente di CADASIL deve sorgere nel caso di disturbi dell'umore insorti in età avanzata senza una storia di disturbi psichiatrici precedenti, senza motivazioni e con scarsa risposta ai trattamenti (27). Sono stati descritti casi in cui la patologia psichiatrica consisteva in un disturbo bipolare (28).

Apatia. Una condizione particolare, frequentemente osservabile nei soggetti affetti di CADASIL, è l'apatia. Questa, in un'ampia coorte di pazienti studiata da Reyes et al. (2009), fu rilevata in oltre il 40% di pazienti (29). L'apatia, sintomo gravemente disabilitante, va distinta dal disturbo depressivo e può essere definita come mancanza di spinte motivazionali e riduzione di interessi nei confronti dell'ambiente; si associa ad un atteggiamento indifferente, ad un appiattimento delle emozioni e degli affetti. Non infrequentemente l'apatia è associata a declino cognitivo, età avanzata e a disabilità globale (29). L'apatia è una condizione organica di patologia la cui base neurofisiologica risiede in un'alterazione del network neuronale che connette i lobi frontali con i gangli della base e le strutture limbiche (30). Ancora di recente, utilizzando una metodica di ri-

sonanza magnetica che identifica i solchi corticali, è stata dimostrata un'associazione tra apatia e morfologia corticale nelle aree orbitofrontale e mediofrontale (31). L'apatia comunque non è un sintomo specifico di CADASIL ma si può osservare nelle malattie cerebrovascolari e nelle malattie degenerative cerebrali (30).

Altre manifestazioni cliniche meno frequenti. Nei pazienti affetti da CADASIL l'epilessia si manifesta con una frequenza del 5-10%. Tipicamente si tratta di epilessia tardiva insorgendo in età avanzata in pazienti con una storia di eventi ischemici e compromissione della sfera cognitiva. Le crisi sono più frequentemente generalizzate di tipo tonico clonico. Si possono osservare, seppur raramente, condizioni di stato di male epilettico.

La compromissione del sistema extrapiramidale è rara, un caso di parkinsonismo in un paziente affetto da CADASIL è stato riportato nel 2003 (32).

Il coinvolgimento del midollo spinale in pazienti affetti da CADASIL è stato riportato solo in pochissimi *case reports* (33-35).

La presenza di patologia del nervo periferico è stata documentata elettrofisiologicamente e attraverso biopsia di nervo (36), ma anche attraverso biopsia cutanea che ha anche permesso l'analisi delle fibre nervose somatiche, di quelle autonome e anche dei vasi (37).

Neuroimaging

Alcune osservazioni anatomopatologiche, che saranno riprese in una sezione successiva, hanno qui l'utilità di raccordare osservazione micro e macroscopica con l'imaging neuroradiologico. La caratteristica anatomopatologica di CADASIL è rappresentata dall'accumulo nella membrana basale delle piccole arterie e delle arteriole di materiale granulare osmofilo (38), con ispessimento fibrotico, stenosi vasale, riduzione del flusso ematico cerebrale (CBF) (39), e conseguente diffusa sofferenza della sostanza bianca e infarti lacunari prevalentemente sottocorticali e del ponte.

L'occlusione dei piccoli vasi arteriosi, destinati alle regioni nucleo-capsulari, al tronco dell'encefalo e alla sostanza bianca, è alla

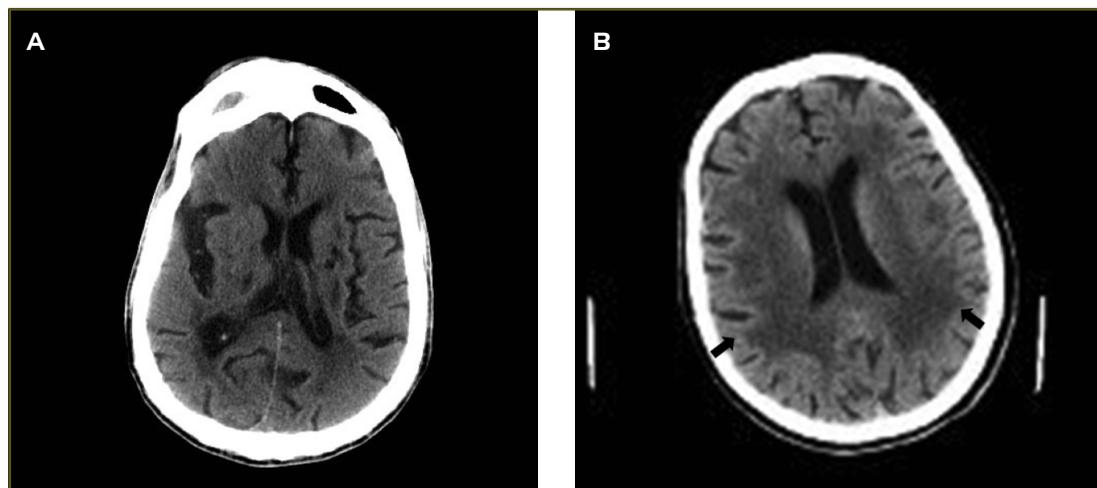


Figura 1 - TC dell'encefalo. Sono visibili i numerosi minuti esiti lacunari nella regione capsulo-lenticolare dei due lati, con interessamento della capsula esterna di sinistra (A) e la leucopatia diffusa che si presenta come chiazze confluenti di ipodensità della sostanza bianca (B).

base delle minute lesioni infartuali profonde denominate “infarti lacunari” o “lacune cerebrali”, per dimensioni, secondo la scala di Scheltens (40), sotto gli 11 mm.

La stenosi degli stessi vasi genera una sofferenza cronica diffusa della sostanza bianca, nota come leucoaraiosi, termine, non specifico, originariamente coniato per indicare l'aspetto TC della rarefazione strutturale della sostanza bianca, espressa da una diffusa ipodensità (e caratterizzata in RM da uno sfumato alto segnale nelle se-

quenze T2 pesate) (41). Il Neuroimaging è in condizioni di ben mostrare sia i piccoli infarti lacunari che la leucoaraiosi, valutabili con cura sia in TC (*Figura 1*) che, con maggiore sensibilità, in RM (*Figura 2*).

Nel CADASIL si documenta un interessamento progressivo e preminente della sostanza bianca profonda o sottocorticale degli emisferi cerebrali.

Gli Infarti lacunari si rivelano in RM come focolai di elevato segnale nelle sequenze SE T2 dipendenti e FLAIR, con tendenza

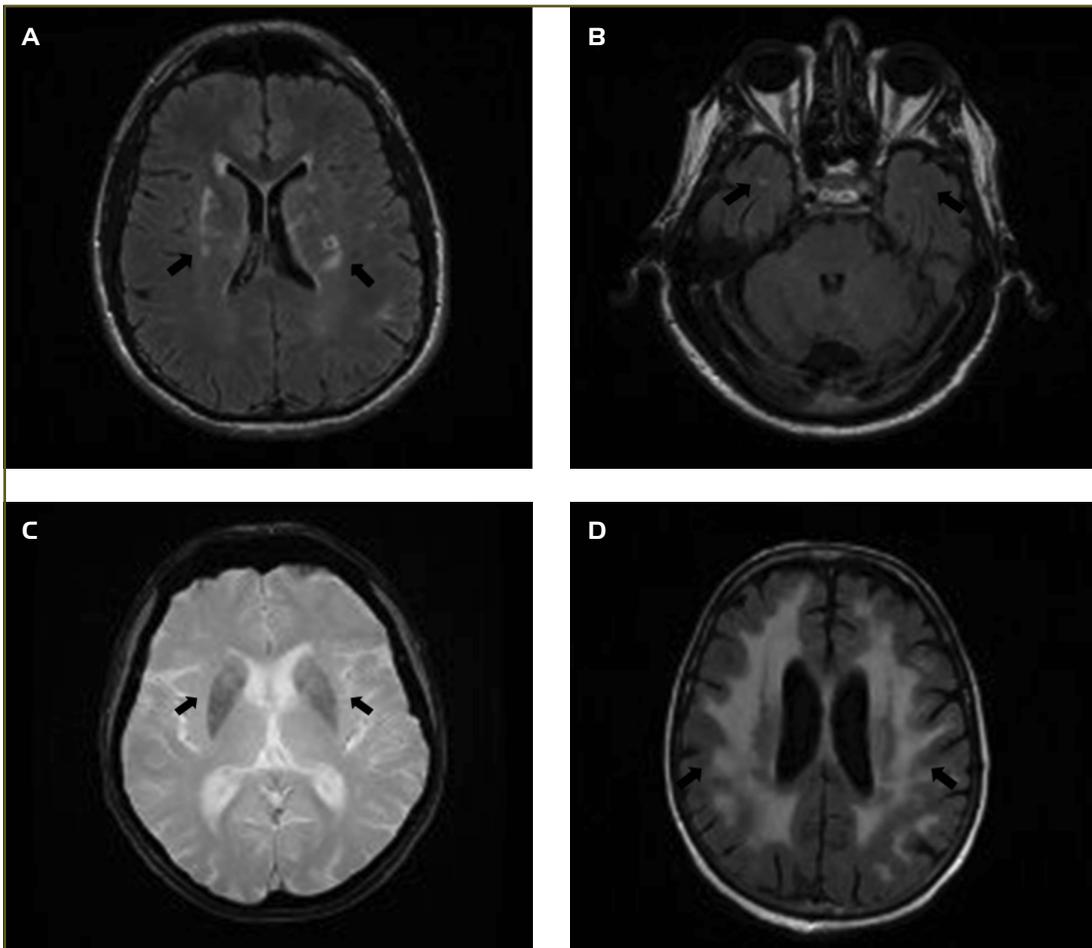


Figura 2 - RM dell'encefalo. *Paziente di 38 anni* - A e B: sequenza FLAIR T2 pesata, sul piano assiale, mostra piccole, focali lesioni nella sostanza bianca sottocorticale e profonda, con interessamento anche delle regioni temporo-polari. C: sequenza GRE T2* pesata, mostra diffuso basso segnale dei nuclei caudati e lenticolari. *Paziente di 60 anni* - D: sequenza FLAIR T2 pesata, sul piano assiale, mostra diffusa e consistente sofferenza della sostanza bianca espressa da chiazze confluenti di iperintensità.

a ridursi di diametro nelle fasi croniche. Tali reperti coinvolgono frequentemente (42) i talami ed il ponte (più raramente i nuclei della base), con associato interessamento multifocale della sostanza bianca periventricolare o profonda (*Figura 3*); queste lesioni sottocorticali coinvolgono con particolare evidenza il centro semiovale, in quanto attraversato da arterie e arteriole a lungo decorso (invece il corpo calloso, in cui predominano vasi di lunghezza minore e con ricche anastomosi, è tipicamente risparmiato).

È inoltre importante non confondere queste lesioni con l'ampliamento degli spazi perivascolari, frequente a livello della porzione inferiore dei nuclei lenticolari, della sostanza bianca dei centri semiovali e in corrispondenza dei peduncoli cerebrali: questi spazi, a differenza dei microinfarti lacunari, sono isointensi al liquor in tutte le sequenze (*Figura 4*).

Le caratteristiche di segnale delle lesio-

ni lacunari infartuali e della leucoaraiosi sono estremamente aspecifiche. Pertanto la diagnosi differenziale con altre patologie della sostanza bianca, si avvantaggia di pattern topografici individuati alla RM.

In particolare la possibilità di differenziare le lesioni di CADASIL con focolai di demielinizzazione nella sclerosi multipla (43) si fonda sulla prevalente localizzazione di questi ultimi a livello della sostanza bianca periventricolare, sulla distribuzione perivenulare con aspetto "a denti di pettine", sulla tendenza alla confluenza e sul frequente interessamento del corpo calloso.

Possibile è anche ipotizzare una differenza in RM tra CADASIL ed encefalopatia aterosclerotica sottocorticale sporadica (sSAE) (43), in quanto nella prima frequente è il coinvolgimento della sostanza bianca temporale (prevalentemente della regione temporo-polare), con interessamento delle fibre arcuate immediatamen-

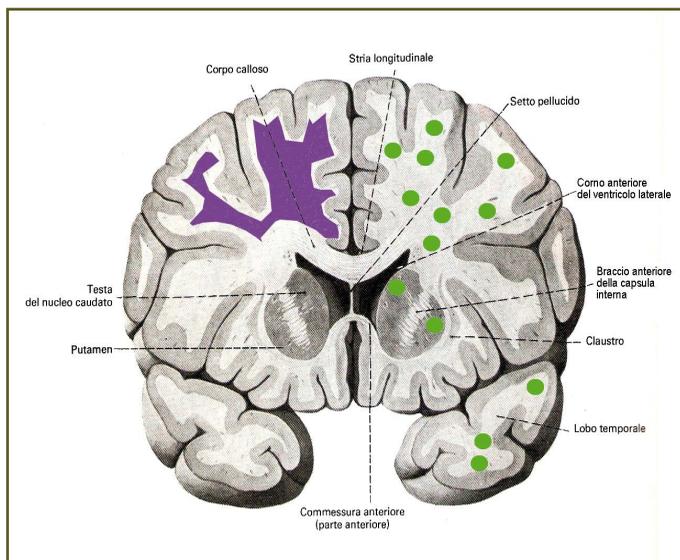


Figura 3 - Sezione frontale del telencefalo, passante al davanti del talamo. Le piccole aree verdi indicano le minute lesioni ischemiche focali che prediligono la sostanza bianca, anche dei lobi temporali, e (più raramente) i nuclei della base. L'estesa area viola esprime la zona di sostanza bianca coinvolta dalla diffusa sofferenza leucopatica. Da Balboni G.C. e coll.: Anatomia Umana, Edi-ermes, Milano 1984, modificata.

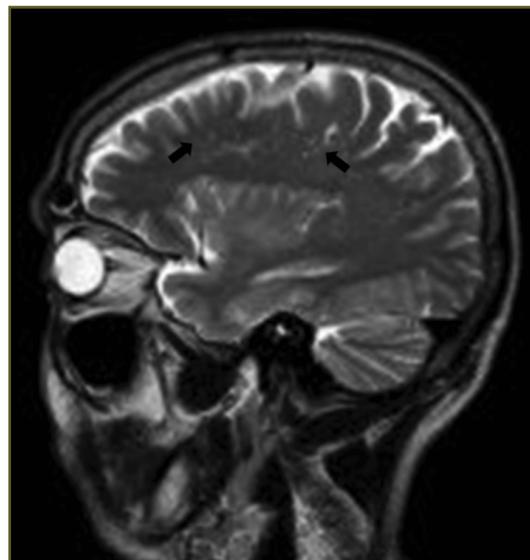


Figura 4 - RM dell'encefalo. Sequenza SE T2 pesata, sul piano sagittale, mostra, nella sostanza bianca degli emisferi cerebrali, numerose immagini puntiformi ed allungate, dello stesso segnale del liquor, da riferire a spazi perivasali ampliati.

te sottocorticali, e della sostanza bianca frontale superiore paramediana così come è frequente il diffuso basso segnale nelle sequenze T2 pesate, soprattutto GRE e SWAN, simmetrico, nei nuclei della base (*Figura 2C*), interpretato come un incremento del deposito di ferro, possibile conseguenza di un disturbo assonale del trasporto di tale metallo (44).

La maggior parte degli infarti lacunari è clinicamente silente, fatta eccezione per le lesioni che colpiscono la capsula interna, ma in caso di multiple ed estese localizzazioni nella sostanza bianca degli emisferi cerebrali con cospicua perdita di tessuto, si giunge a situazione di demenza.

Gli infarti lacunari, millimetrici, possono essere comunque di varia grandezza ed estensione, con perdita di sostanza variabile.

Il volume totale delle lesioni è pertanto un importante parametro correlato alla disabilità e può essere d'aiuto a predire la storia naturale della malattia (45).

È documentato che il coinvolgimento encefalico progredisce con l'età (46) ed in base ai reperti RM si possono distinguere 3 stadi clinico-radiologici (46):

- 1° stadio. Inizia in età giovanile con emicrania. Alla RM si dimostrano rare lesioni focali nella sostanza bianca prevalentemente sottocorticale;
- 2° stadio. Si manifesta tra i 40 e i 60 anni, con stroke ripetuti. Alla RM si evidenziano numerosi infarti sottocorticali negli emisferi cerebrali e lesioni dei nuclei della base;
- 3° stadio. Si rileva in genere dopo i 60 anni ed è caratterizzato da demenza e segni pseudobulbari. Alla RM si rileva una leucoencefalopatia sottocorticale diffusa. Le lesioni sono estese e confluenti, iperintense in sequenze SE T2 dipendenti o FLAIR; interessano anche le capsule esterne e la sostanza bianca temporale.

La correlazione tra il danno individuabile in RM e la consistenza clinica della patologia pone pertanto la risonanza in un ruolo centrale nella diagnosi e nel monitoraggio dei pazienti con CADASIL (47).

Neuropatologia

Le alterazioni anatomiche, macroscopiche e microscopiche, osservabili in CADASIL sono sovrapponibili a quelle della encefalopatia di Binswanger. Si rilevano infarti multipli prevalentemente sottocorticali con perdita di mielina a livello dei centri semiovali. Gli infarti ischemici si osservano soprattutto nelle zone periventricolari oltre che a livello dei lobi temporali e dei gangli della base (48). Gli studi di microscopia e le analisi ultrastrutturali hanno dimostrato come proprio le piccole arterie penetranti e le arteriole leptomeningee presentino un ispessimento della parete vascolare con riduzione del lume vasale talvolta fino all'occlusione (49). Anche se il coinvolgimento delle piccole arterie e delle arteriole è prevalente alcuni autori hanno sostenuto che anche le grosse arterie possono essere coinvolte (50, 51). A livello della media si può osservare l'accumulo di materiale granulare osmofilo (GOM), elettron-denso all'osservazione con microscopia elettronica. Questo materiale, caratteristico di CADASIL, si ritrova nel versante extracellulare addossato alla superficie delle cellule muscolari lisce (52) (*Figura 5*). La componente principale dei GOM sarebbe, secondo Ishiko et al. (2006), proprio il prodotto del gene NOTCH3 (53). I GOM sono presenti non solo nel tessuto cerebrale, ma anche in altri organi come fegato, rene, muscoli (38). I meccanismi che inducono il danno tissutale in CADASIL si differenziano da quelli operanti nell'aterogenesi in fase iniziale; in questa, l'alterazione dell'endotelio induce l'espressione di molecole

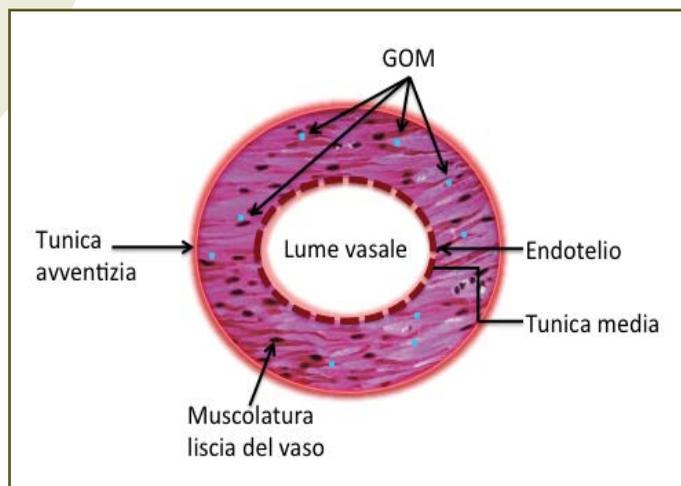


Figura 5 - Rappresentazione schematica di un'arteriola cerebrale. Si noti la presenza di GOM (in azzurro) nel contesto della muscolatura liscia del vaso.

di adesione che legano cellule della serie bianca (monociti e linfociti) e lipoproteine a bassa densità (LDL).

La diagnosi di CADASIL si avvale della presenza e quindi della individuazione dei GOM nel tessuto cutaneo attraverso biopsia e successivo studio ultrastrutturale mediante microscopia elettronica (54, 55). La cute può essere ancora impiegata per una procedura diagnostica di alta sensibilità e specificità; l'immunostaining di un campione di cute con anticorpi monoclonali anti Notch3 può mostrare la proteina nella parete dei vasi (55).

Genetica molecolare

Come già detto, CADASIL è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta. Il fenotipo si manifesta a ogni generazione; i genitori trasmettono la malattia ai figli, indipendentemente dal sesso, con una probabilità che essi siano malati pari al 50%. I primi studi che hanno mappato CADASIL al cromosoma 19q12, attraverso l'analisi di linkage in due grandi famiglie francesi,

risalgono al 1993 (1). Due anni più tardi sono stati pubblicati, quasi contemporaneamente, altri studi in merito: uno di questi, basato su un grande pedigree Scozzese in cui la demenza multiinfartuale ereditaria era stata confermata neuropatologicamente, non convalidava tale linkage, utilizzando marcatori polimorfici compresi nella stessa regione (56). Intanto, almeno altri due studi dimostravano linkage al 19p (57, 58). Nello studio di Ragno et al. (57) veniva dimostrato un massimo lod score di 3.660 a $\theta=0,05$ per il marcatore D19S226 in una famiglia italiana in cui 16 soggetti, sintomatici e asintomatici, presentavano evidenze radiologiche di leucoencefalopatia. L'esame neuropatologico di uno dei soggetti, mostrava vasculopatia diffusa delle arterie perforanti, caratterizzata da depositi di materiali eosinofili e congofili che non reagivano, con tecniche di immunostaining, con anticorpi contro la proteina prionica, la beta amiloide, la cistatina C, la transtiretina e la HSP70 (57). Alle due grandi famiglie francesi, in cui il linkage era stato dimostrato in un intervallo di 12-cM sul cromosoma 19, si aggiunsero altre 13 famiglie. Il massimo lod score (maximum lod=37,24 a $\theta=,01$) era raggiunto con il marcatore D19S841, riducendo così l'intervallo di linkage a 2-cM sul 19p13.1. Questi dati supportavano fortemente l'omogeneità genetica di questa patologia, dando valore ai criteri diagnostici basati sull'osservazione clinica e neuroradiologica (59).

Nel 1996 fu caratterizzato il gene NOTCH3 (Neurogenic locus notch homolog protein 3), che mappa nella regione critica, attraverso l'identificazione di mutazioni in pazienti affetti da CADASIL (60). Il gene NOTCH3 è localizzato sul braccio corto del cromosoma 19, nel locus 19p13.2-p13.1, ed è un membro della famiglia dei geni NOTCH, costituita da 4 geni

(NOTCH1, 2, 3, 4) presenti nel genoma dei mammiferi e omologhi del gene NOTCH di *Drosophila* (61). Tali geni codificano recettori di membrana a singolo passo di circa 300kD, con un singolo dominio transmembranario, coinvolto nell'interazione con i ligandi DSL (Delta-Serrate Ligand) e una coda intracitoplasmatica, responsabile della trasduzione del segnale. Questi recettori sono coinvolti nel controllo delle principali tappe differenziative di numerosi tipi cellulari e nella regolazione dello sviluppo di diversi organismi multicellulari (62). I recettori Notch sono gli elementi che danno il nome al "Notch signaling pathway" che rappresenta il pathway più utilizzato negli organismi animali durante lo sviluppo e presenta un'alta omologia a partire dai nematodi fino all'uomo (62-64). Questi recettori controllano, tramite interazioni cellulari locali, la capacità di cellule non ancora completamente differenziate di rispondere a segnali di maturazione, di proliferazione e di differenziamento (65). Il gene NOTCH3 si estende per 7 kb [GenBank: AH006054.1] ed è strutturato in 33 esoni. Gli esoni dal 2 al 23 codificano i 34 domini EGF-like (Epidermal Growth Factor) della proteina Notch3; proprio in questa porzione che sono state riscontrate tutte le mutazioni inconfutabilmente responsabili della patologia. Il 94% delle mutazioni riportate nel gene NOTCH3 e associate al CADASIL, sono mutazioni di tipo missenso che portano invariabilmente all'aggiunta o alla perdita di un residuo di cisteina in uno dei 34 domini EGF-like della porzione extracellulare aminoterminale del recettore Notch3 e le variazioni più ricorrenti sono transizioni C→T nelle isole CpG (15, 66). Normalmente ogni dominio EGF è composto da 40-50 aminoacidi e contiene invariabilmente sei residui di cisteina altamente conservati che danno luogo alla formazione di tre ponti disolfu-

ro, necessari per la stabilità della proteina e per le interazioni proteina-proteina (67). Le mutazioni, portando le cisteine a un numero dispari, provocano il "misfolding" del dominio extracellulare della proteina Notch3 alterandone la conformazione (68, 69). Ciò potrebbe determinare un'alterazione del suo processamento, la formazione di omo- o eterodimeri anomali sulla membrana o ancora potrebbe impedire l'interazione di Notch3 con i suoi ligandi (55). Le mutazioni responsabili di CADASIL fino ad oggi descritte sono: 203 di tipo *missenso*, 2 nei siti di *splicing*, 6 piccole delezioni *frame-shift* e *in-frame*, 3 piccole inserzioni, 1 piccola *ins-del* e 1 grossa delezione [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NOTCH3>]; in aggiunta sono stati descritti numerosi polimorfismi nelle regioni codificanti del gene, sia sinonimi che non sinonimi (68, 70, 71). Diversi studi condotti in Europa avevano messo in evidenza come la maggior parte delle mutazioni, più del 70-80%, ricadevano negli esoni 3 e 4 del gene, per cui suggerivano che l'analisi di questi due esoni fosse sufficiente per inquadrare geneticamente la maggior parte dei casi clinici (49, 60, 72). Questa visione, in tempi successivi, è stata confutata da uno studio italiano che dimostra come le mutazioni si distribuiscono nei vari esoni secondo la popolazione che si prende in considerazione, suggerendo che l'algoritmo che bisogna seguire nell'iter diagnostico è dipendente dalla popolazione in esame (12). La *figura 6* mostra uno schema della struttura del gene NOTCH3 con i siti delle mutazioni missenso riportate.

Biologia cellulare

La proteina Notch3 è costituita da 2321 aminoacidi (60) disposti, nella porzione extracellulare aminoterminale (N3ECD),

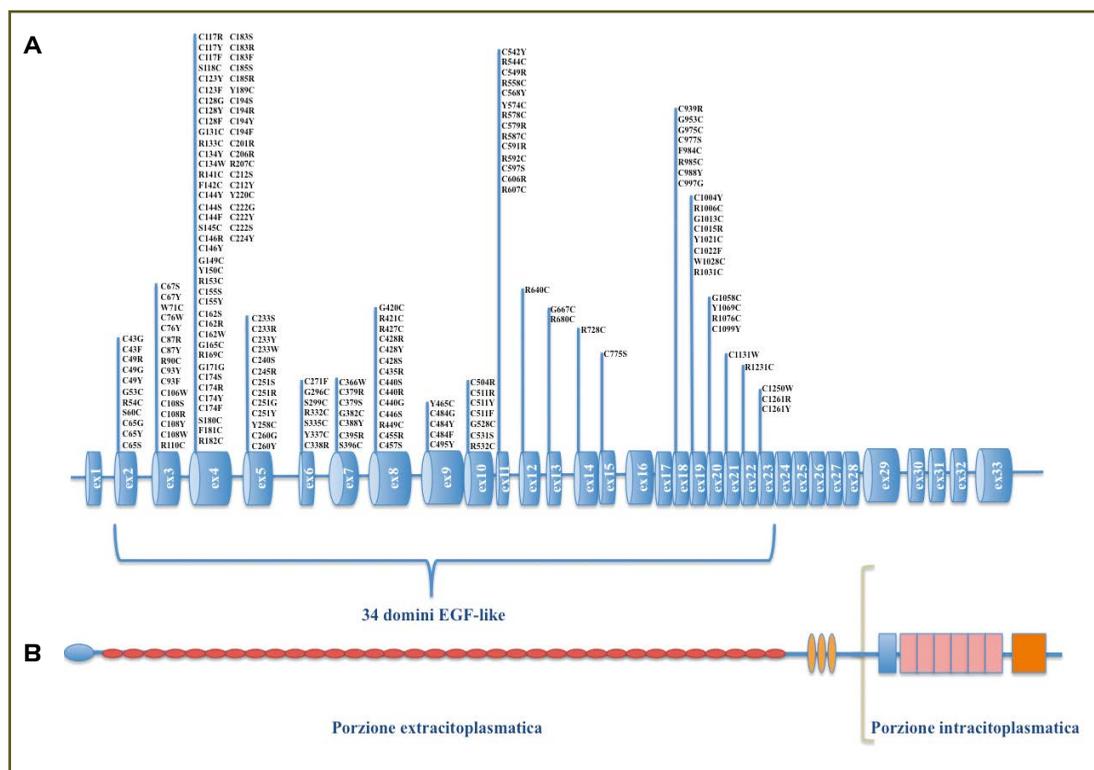


Figura 6 - Schematizzazione del recettore Notch3 e del gene che lo codifica. In basso (B), il recettore dall'estremità N-terminale (a sinistra) all'estremità COOH-terminale. Sopra (A), il gene NOTCH3 composto da 33 esoni con evidenza degli esoni che codificano i 34 domini EGF-like del recettore. Infine, sono riportate le mutazioni missenso riportate in letteratura. Dall'immagine è evidente come le mutazioni ricadono più frequentemente nei primi esoni del gene, con una frequenza particolarmente alta nell'esone 4.

in 34 sequenze di tipo EGF ripetute in tandem, seguite da 3 sequenze ripetute di tipo Notch/LIN-12 (LNR), nelle quali i residui di cisteina sono molto abbondanti; ancora, da un singolo dominio transmembranario e, infine, dalla porzione intracitoplasmatica carbossiterminale (N3ICD) composta da 6 sequenze ripetute cdc/anchirina (68) (Figura 6). La proteina si localizza sulla membrana cellulare in forma di eterodimero, formato da un dominio extracellulare e da un dominio intracitoplasmatico agganciato alla membrana: le due porzioni sono unite con un legame non covalente. Il recettore Notch3, una volta sintetizzato nel reticolo endoplasmatico rugoso, va incontro a modificazioni post-traduzionali a

livello della porzione *trans* dell'apparato di Golgi, mediante l'azione proteolitica esplicata da parte di vari enzimi. A livello del Golgi, la proteina subisce un primo taglio che porta alla formazione di un frammento di 210 kDa, che costituirà la porzione extracellulare, e di un frammento più piccolo, di 97 kDa, comprendente le porzioni intracellulare e transmembranaria. La proteina matura, viene infine traslocata alla superficie della membrana cellulare, ove rimane associata come eterodimero attraverso un legame non covalente di tipo calcio-dipendente (65, 73). L'interazione ligando-recettore induce un successivo taglio proteolitico che porta al distacco dalla membrana dei domini N3ECD e N3ICD

del recettore: il primo viene rilasciato nella matrice extracellulare insieme al dominio extracellulare del ligando, mentre il secondo trasloca dalla membrana cellulare al nucleo (74).

I ligandi dei recettori Notch sono codificati dalle famiglie geniche Jagged (JAG1 e JAG2) e Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4); anch'essi sono proteine transmembrana con un solo dominio transmembranario e un dominio extracellulare contenente ripetizioni in tandem EGF-like (75). Una volta nel nucleo, tale dominio interagisce con il fattore di trascrizione, analogo al RBPSUH in *Drosophila*, RBP-J (Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region) e altri coattivatori, con i quali si lega a sequenze specifiche del DNA per attivare la trascrizione di geni (76).

Nella *Drosophila*, quando il meccanismo segnalatorio Notch-dipendente non è attivo, la proteina RBPSUH si lega a specifiche sequenze regolatrici di geni target e ne reprime la trascrizione attivando deacetilasi istoniche e altri elementi di un complesso corepressore. La traslocazione nucleare di N3ICD rimuove il legame tra il complesso corepressore-deacetilasi istoniche e la proteina RBPSUH, consentendo l'attivazione trascrizionale di geni bersaglio, tra i quali, ad esempio, HEY ed HES implicati nella vasculogenesi (75).

Studi condotti su topi transgenici NOTCH3^{-/-} hanno dimostrato che il recettore Notch3 è indispensabile sia per un corretto processo di differenziazione e maturazione delle cellule della muscolatura liscia vasale (VSCM) (77), essenziale a sua volta per la formazione di arterie funzionali, sia per il mantenimento dell'omeostasi vascolare (78). La proteina Notch3, infatti, conferisce alla VSCM la capacità di riarrangiare il citoscheletro in risposta allo stiramento meccanico della parete dei

vasi causato dalla pressione intramurale (77). A tale proposito è da rilevare che la proteina Notch3, sia nell'uomo sia nei roditori, nelle ultime fasi dell'embriogenesi e nella fase adulta, viene espressa prevalentemente a livello delle cellule della muscolatura liscia arteriolare (73, 79). Inoltre, esperimenti condotti su topi transgenici che esprimono il gene NOTCH3 umano mutato hanno evidenziato lo sviluppo di anomalie vascolari tipiche del CADASIL (80): ciò costituisce un'ulteriore conferma del ruolo svolto dalla proteina nello sviluppo e nel mantenimento dell'omeostasi del sistema arteriolare.

Infine, la co-espressione delle proteine Notch e delle preseniline (proteine coinvolte nella genesi della malattia di Alzheimer) nel sistema nervoso centrale (SNC) e nelle cellule del sistema vascolare degli adulti suggerisce che la famiglia dei geni Notch svolge un ruolo essenziale anche in altri meccanismi biologici, come la morte cellulare programmata (62).

Numerosi studi hanno indagato il meccanismo dei geni NOTCH e le loro interazioni con altri sistemi cellulari fisiologici, evidenziando relazioni tra il Notch signaling e il sistema vascolare: infatti, componenti del sistema Notch sono espressi a vario livello durante lo sviluppo dei vasi, sia nell'endotelio, sia nelle cellule di supporto (81, 82). Inoltre, è stato dimostrato che mutazioni nei geni codificanti sia i recettori Notch che i rispettivi ligandi, indipendentemente dall'aumento o dalla diminuzione dell'attività di segnale, danno origine a fenotipi simili nel topo, caratterizzati da morte embrionale dovuta ad emorragia secondaria a difetti nella morfogenesi vascolare. In particolare, in questo processo sembrerebbe essere coinvolto un rimodellamento angiogenico, non tanto nelle prime fasi di vasculogenesi, ma piuttosto a uno stadio successivo di

ramificazione e differenziazione dei vasi (83). L'importanza dei geni Notch nello sviluppo del sistema cardiovascolare è anche avvalorata dalle severe anomalie vascolari riscontrate nella sindrome di Alagille (AGS), causata da mutazioni nel gene Jagged 1 che codifica uno dei ligandi di Notch (84, 85).

Un quadro completo della funzione dei recettori Notch si può avere attraverso lo studio delle mutazioni nei loro geni. In particolare, mutazioni negli elementi del Notch signaling pathway sono coinvolte nella sindrome di Alagille (84), nel CADASIL (60), e nella sindrome di Hajdu-Cheney (86); inoltre, livelli di espressione di Notch anomali sono correlati con la sindrome di Down (87) e con la malattia di Alzheimer (88).

Diagnosi

Considerata la variabilità del quadro clinico e dei sintomi d'esordio e tenuto conto che la modalità di presentazione è mutevole anche nell'ambito della stessa famiglia, si può affermare che diagnosticare CADASIL ai primi sintomi è arduo. Certamente una storia familiare di stroke ricorrente, disturbi psichiatrici e demenza, in associazione con emicrania con aura, può essere di notevole aiuto. Tuttavia è stato riportato che raramente la storia familiare contribuisce alla diagnosi di CADASIL; nel 35% di pazienti la diagnosi iniziale è altra, e in questi casi la storia familiare è apparentemente negativa (89). Certamente le indagini neuroradiologiche possono essere d'aiuto, anche se, in fase iniziale, la RM dell'encefalo può non presentare alterazioni tipiche e suggerire una diagnosi neuroradiologica di emicrania o di Sclerosi Multipla. Altra condizione che può fuorviare dalla corretta diagnosi è quella in cui le manifestazioni ictali si presentano oltre

i 50 anni in soggetti con fattori di rischio per patologie vascolari (fumo, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, ed altro). In tal caso, in assenza di una storia familiare positiva, è possibile ipotizzare un'encefalopatia vascolare. In ogni caso, una volta ipotizzata la presenza di CADASIL sulla base della storia e della RM dell'encefalo, l'analisi genetica e lo studio neuropatologico dovrebbero portare alla conclusione diagnostica. La diagnostica genetica di CADASIL si basa sullo screening del gene NOTCH3 alla ricerca di mutazioni. Il gene contiene 33 esoni e pertanto la sua analisi completa è dispendiosa in termini economici e di tempo impiegato. Sulla base di uno studio che riportava come il 70% dei pazienti presentava una mutazione nell'esone 3 o 4 (4), fu suggerito di limitare l'analisi a questi esoni. Studi successivi tuttavia allargando lo spettro delle mutazioni del gene proposero lo scanning anche degli esoni 6, 11 e 18 (90).

Dotti et al. hanno studiato lo spettro delle mutazioni di NOTCH3 in 28 famiglie italiane ed hanno osservato come questo diverga da quanto pubblicato per altre popolazioni. La frequenza più elevata di mutazioni nella popolazione italiana studiata è stata individuata nell'esone 11. La conclusione degli autori è che esistono spettri di mutazione specifici per popolazione (12). La diagnostica genetica di CADASIL dovrebbe tener conto del pattern di mutazione della popolazione di appartenenza del paziente ed estendere lo screening agli esoni specifici.

La diagnosi morfologica si esegue su biopsie di cute. La presenza di Materiale Osmofilo Granulare (Granular Osmophilic Material, GOM) nelle arteriole cutanee è diagnostica. Tuttavia, nonostante la biopsia di cute abbia un'elevata specificità (100%), la sua sensibilità è risultata pari a 45% (72).

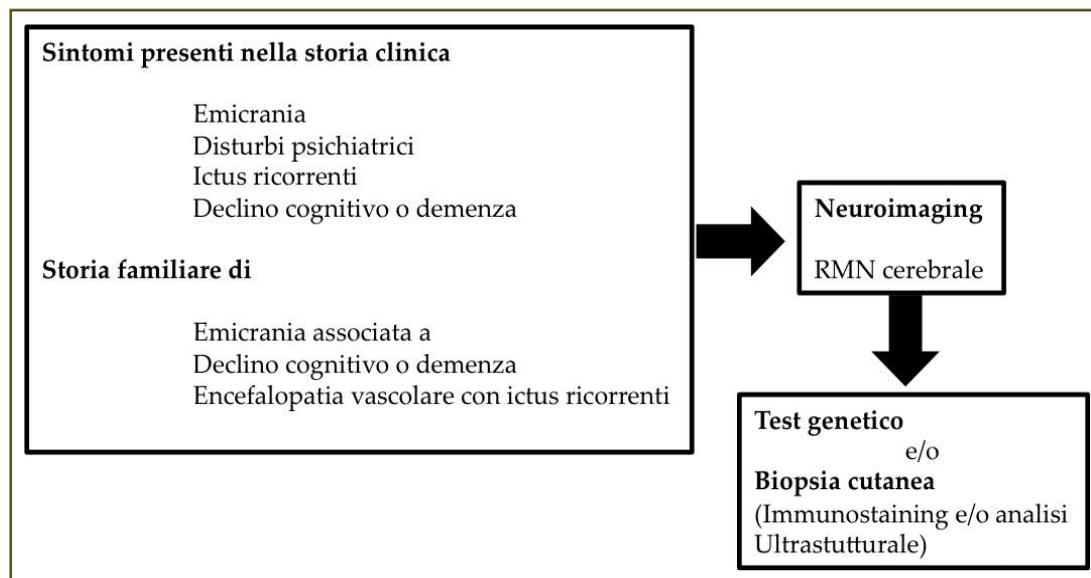


Figura 7 - Schema del percorso diagnostico per CADASIL.

In uno studio sulle strategie diagnostiche nel CADASIL, Markus et al. (72) hanno osservato come la combinazione dei markers radiologici in associazione al sequenziamento dell'esone 4 abbia una sensibilità del 100% (72). La sensibilità della biopsia cutanea nella diagnosi di CADASIL è del 100% quando viene effettuato un immunostaining delle arteriole con anticorpi monoclonali anti-Notch3 (55). La *figura 7* rappresenta uno schema di procedura diagnostica per CADASIL dove la storia clinica risulta preminente e la diagnostica strumentale (RM) va a confermare o a confutare l'ipotesi diagnostica che viene ulteriormente verificata dalla biopsia di cute e definitivamente provata dall'analisi genetico-molecolare.

Trattamento

Al momento non vi sono trattamenti specifici per CADASIL. Sono stati ipotizzati interventi di silenziamento del gene mutato con molecole di RNA o attraverso il superamento della sequenza di DNA

mutato mediante oligonucleotidi antisense (11).

Certamente, il controllo dei fattori di rischio vascolare è da tenere in considerazione, in particolare ipertensione e fumo di sigaretta (17). Anche sull'uso di antiaggreganti piastrinici o anticoagulanti vi è molta incertezza. L'emicrania può essere trattata con i farmaci convenzionali. Sono stati pubblicati alcuni articoli che sostengono una possibile efficacia di acetazolamide nel trattamento dell'emicrania nel CADASIL. Si tratta di reports aneddotici (91, 92) e di uno studio retrospettivo su un piccolo numero di pazienti (93).

L'efficacia di Donepezil, un inibitore di Acetilcolina esterasi, è stata testata in 168 pazienti affetti da CADASIL con demenza, in uno studio randomizzato, controllato, in doppio cieco. I risultati dello studio mostrarono solo degli effetti positivi su end-points secondari d'importanza clinica minore (93).

“Si ringrazia il Professor Renato Fellin per i preziosi suggerimenti”.

Glossario

CADASIL: Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy.	EGF: Epidermal Growth Factor.
NOTCH3: Neurogenic locus notch homolog protein 3.	CpG: Citosina-legame fosfodiesterasico (p)-Guanina. Isole CpG: Porzioni di DNA con elevata frequenza di CpG.
RM: Risonanza Magnetica.	N3ECD: Notch3 Ectodomain.
FLAIR: Fluid Attenuated Inversion Recovery.	LNR: Lin-12/Notch repeat.
GRE: gradient recalled echo.	N3ICD: Notch3 Intracitoplasmatic domain.
SWAN: T2 star weighted angiography.	RBPSUH: Recombining Binding Protein Suppressor of Hairless.
sSAE: sporadic Subcortical Atherosclerotic Encephalopathy.	RBP-J: Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region
GOM: Granular Osmophilic Material.	HEY: Hairy Ears Y-Linked.
HSP70: Heat Shock Protein 70.	HES: Hairy and Enhancer of Split.
cM: centimorgan.	VSCM: Vascular smooth cell muscle.
DSL: Delta-Serrate Ligand.	AGS: Alagille syndrome.

RIASSUNTO

CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante che provocando un danno dei piccoli vasi del cervello determina un'encefalopatia vascolare sottocorticale. La malattia è dovuta a una mutazione nel gene NOTCH3 che codifica per una proteina di membrana che ha un ruolo essenziale nei processi di differenziamento e maturazione delle cellule muscolari dei vasi. La frequenza della malattia non è nota, ma si ritiene che sia notevolmente sottostimata. CADASIL, clinicamente, si caratterizza per la presenza di emicrania con aura, ictus ricorrenti, demenza e disturbi psichiatrici. La storia naturale della malattia è molto variabile anche nell'ambito della stessa famiglia. Le tecniche di neuroimaging sono uno strumento diagnostico indispensabile. La conferma diagnostica si ottiene attraverso la biopsia cutanea e l'analisi genetico-molecolare. Non sono al momento disponibili trattamenti per la malattia.

Parole chiave: *Ictus ischemico, demenza, emicrania, malattia dei piccoli vasi.*

Bibliografia

1. 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: 256-259.
2. van Bogaert L. Encephalopathie sous-corticale progressive (Binswanger) a evolution rapide sous deuz soeurs. *Med Hellen.* 1955; 24: 961-972.
3. Sourander P, Walinder J. Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. *Acta Neuropathol.* 1977; 39: 247-254.
4. Stevens DL, Hewlett RH, Brownell B. Chronic familial vascular encephalopathy. *Lancet.* 1977; 1: 1364-1365.
5. Low WC, Junna M, Borjesson-Hanson A, Morris CM, Moss TH, Stevens DL, et al. Hereditary multi-infarct dementia of the Swedish type is a novel disorder different from NOTCH3 causing CADASIL. *Brain.* 2007; 130 (Pt 2): 357-367.
6. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssiere C, et al. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet.* 1997; 350: 1511-1515.
7. Razvi SS, 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: 739-741.
8. 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: 203-205.

9. Kilarski LL, Rutten-Jacobs LC, Bevan S, Baker R, Hassan A, Hughes DA, Markus HS; UK Young Lacunar Stroke. Prevalence of CADASIL and Fabry Disease in a Cohort of MRI Defined Younger Onset Lacunar Stroke. *PLoS One*. 2015; 10: e0136352.
10. 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: 2215-2218.
11. Tikka S, Baumann M, Siitonen M, Pasanen P, et al. CADASIL and CARASIL, *Brain Pathology*. 2014; 24: 525-544.
12. Dotti MT, Federici A, Mazzei R, Bianchi S, Scali O, et al. The spectrum of Notch3 mutations in 28 Italian CADASIL families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76: 736-738.
13. Desmond DW, Moroney JT, Lynch T, Chan S, Chin SS, Mohr JP. The natural history of CADASIL: a pooled analysis of previously published cases. *Stroke*. 1999; 30: 1230-1233.
14. Chabriat H, Joutel A, Dichgans M, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. CADASIL. *Lancet Neurol*. 2009; 8: 643-653.
15. Dichgans M, Mayer M, Uttner I, et al. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann Neurol*. 1998; 44: 731-739.
16. Peters N, Herzog J, Opherck C, Dichgans M. A two-year clinical follow-up study in 80 CADASIL subjects: progression patterns and implications for clinical trials. *Stroke*. 2004; 35: 1603-1608.
17. 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: 630-634.
18. Lian L, Li D, Xue Z, Liang Q, Xu F, Kang H, et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage in CADASIL. *J Headache Pain*. 2013; 14:98.
19. Choi JC, Kang SY, Kang JH, Park JK. Intracerebral hemorrhages in CADASIL. *Neurology*. 2006; 67: 2042-2044.
20. Sacco S, Degan D, Carolei A. Diagnostic criteria for CADASIL in the International Classification of Headache Disorders (ICHD-II): are they appropriate? *J Headache Pain*. 2010; 11: 181-186.
21. Hutchinson M, O'Riordan J, Javed M, Quin E, Macerlaine D, et al. Familial hemiplegic migraine and autosomal dominant arteriopathy with leukoencephalopathy (CADASIL). *Ann Neurol*. 1995; 38: 817-824.
22. Sacco S, Rasura M, Cao M, Bozzao A, Carolei A. CADASIL presenting as status migrainosus and persisting aura without infarction. *J Headache Pain*. 2009; 10: 51-53.
23. Taillia H, Chabriat H, Kurtz A, et al. Cognitive alterations in non-demented CADASIL patients. *Cerebrovasc Dis*. 1998; 8: 97-101.
24. Buffon F, Porcher R, Hernandez K, et al. Cognitive profile in CADASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77: 155-180.
25. Valenti R, Poggese A, Pescini F, Inzitari D, Pantoni L. Psychiatric disturbances in CADASIL: a brief review. *Acta Neurol Scand*. 2008; 118: 291-295.
26. Spalletta G, Bossa P, Ciaramella A, et al. (2006) The aetiology of post-stroke depression: a review of the literature and a new hypothesis involving inflammatory cytokines *Molecular Psychiatry*. 2006; 11: 984-991.
27. Leyhe T, Wiendl H, Buchkremer G, Wormstall H. CADASIL: underdiagnosed in psychiatric patients? *Acta Psychiatr Scand*. 2005; 111: 92-397.
28. Kumar SK, Mahr G. CADASIL presenting as bipolar disorder. *Psychosomatics*. 1997; 38: 397-398.
29. Reyes S, Viswanathan A, Godin O, et al. Apathy: a major symptom in CADASIL. *Neurology*. 2009; 72: 905-910.
30. Levy R, Dubois B. Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex*. 2006; 16: 916-928.
31. Jouvent E, Reyes S, Mangin J-F, et al. Apathy is related to cortex morphology in CADASIL: A sulcal-based morphometry. *Neurology*. 2011; 76: 1472-1477.
32. Van Gerpen JA, Ahlskog JE, Petti GW. Progressive supranuclear palsy phenotype secondary to CADASIL. *Parkinsonism Relat Disord*. 2003; 9: 367-369.
33. Bentley P, Wang T, Malik O, Nicholas R, Ban M, Sawcer S et al. CADASIL with cord involvement associated with a novel and atypical NOTCH3 mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011; 82: 855-860.
34. Hinze S, Goonasekera M, Nannucci S, Quaghebeur G, Briley D et al. Longitudinal extensive spinal cord infarction in CADASIL. *Pract Neurol*. 2015; 15: 60-62.
35. Pinto WB, Souza PV, Oliveira AS. Longitudinally extensive transverse myelopathy in a patient with CADASIL. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015; 73: 812.
36. Sicurelli F, Dotti MT, De Stefano N, Malandrini A, Mondelli M, et al. Peripheral neuropathy in CADASIL. *J Neurol*. 2005; 252: 1206-1209.
37. Nolano M, Provitera V, Donadio V, et al. Cutaneous sensory and autonomic denervation in CADASIL. *Neurology*. published online February 12, 2016.
38. Ebke M, Dichgans M, Bergmann M, et al. CADASIL: skin biopsy allows diagnosis in early stages. *Acta Neurol Scand*. 1997; 95: 351-357.
39. Miao Q, Paloneva T, Tuominen S, 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: 358-364.
40. Scheltens P, Barkhof F, Leys D, et al. A semiquantitative rating scale for the assessment of signal hyperintensities on magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci.* 1993; 114: 7-12.
 41. Hachinski VC, Potter P, Merskey H. Leuko-ara-osis: an ancient term for a new problem. *Can J Neurol Sci.* 1986; 13: 533-534.
 42. Auer DP, Putz B, Gossel C, et al. Differenzial lesion patterns in CADASIL and sporadic subcortical atherosclerotic encephalopathy: MR imagin study with statistical parametric group comparison. *Radiology.* 2001; 218: 443-451.
 43. O'Riordan S, Nor AM, Hutchinson M. CADASIL imitating multiple sclerosis: the importance of MRI markers. *Mult Scler.* 2002; 8: 430-432.
 44. Cross PA, Atlas SW, Grossman RI. MR evaluation of brain iron in children with cerebral infarction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1990; 11: 341-348.
 45. Yousry TA, Seelos K, Mayer 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). *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999; 20: 91-100.
 46. Singhal S, Rich P, Markus HS. The spatial distribution of MR imaging abnormalities in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy and their relationship to age and clinical features. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005; 26: 2481-2487.
 47. Verin M, Rolland Y, Landgraf F, et al. New phenotype of the cerebral autosomal dominant arteriopathy mapped to chromosome 19: migraine as the prominent clinical feature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995; 59: 579-585.
 48. Viswanathan A, Gray F, Bousser MG, Baudrimont M, Chabriat H. Cortical neuronal apoptosis in CADASIL. *Stroke.* 2006; 37: 2690-2695.
 49. Kalimo H, Ruchoux MM, Viitanen M, Kalaria RN. CADASIL: a common form of hereditary arteriopathy causing brain infarcts and dementia. *Brain Pathol.* 2002; 12: 371-384.
 50. Choi EJ, Choi CG, Kim JS. Large cerebral artery involvement in CADASIL. *Neurology.* 2005; 65: 1322-1324.
 51. Kang HG, Kim JS. Intracranial arterial disease in CADASIL patients. *J Neurol Sci.* 2015; 359: 347-350.
 52. Ruchoux MM, Chabriat H, Bousser MG, Baudrimont M, Tournier-Lasserre E. Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL. *Stroke.* 1994; 25: 2291-2292.
 53. 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.
 54. Tikka S, Mykkanen K, Ruchoux MM, et al. Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain.* 2009; 132: 933-939.
 55. Joutel A, Favrole P, Labauge P, et al. Skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet.* 2001; 358: 2049-2051.
 56. St Clair D, Bolt J, Morris S, Doyle D. Hereditary multi-infarct dementia unlinked to chromosome 19q12 in a large Scottish pedigree: evidence of probable locus heterogeneity. *J Med Genet.* 1995; 32: 57-60.
 57. Ragno M, Tournier-Lasserre E, Fiori MG, Manca A, Patrosso MC, Ferlini A, Sirocchi G, Trojano L, Chabriat H, Salvi F. An Italian kindred with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Ann Neurol.* 1995; 38: 231-236.
 58. Sabbadini G, Francia A, Calandriello L, Di Biasi C, Trasimeni G et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). Clinical, neuroimaging, pathological and genetic study of a large Italian family. *Brain.* 1995; 118: 207-215.
 59. Ducros A, Nagy T, Alamowitch S, Nibbio A, Joutel A, et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, genetic homogeneity, and mapping of the locus within a 2-cM interval. *Am J Hum Genet.* 1996; 58: 171-181.
 60. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature.* 1996; 383: 707-710
 61. Theodosiou A, Arhondakis S, Baumann M, Kosida S. Evolutionary scenarios of Notch proteins. *Mol Biol Evol.* 2009; 26: 1631-1640.
 62. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999; 284: 770-776.
 63. Beatus P, Lendahl U. Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res.* 1998; 54: 125-136.
 64. Levitan D, Greenwald I. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature.* 1995; 377: 351-354.
 65. Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev.* 1994; 46: 123-136.
 66. Dichgans M, Herzog J, Gasser T. NOTCH3 muta-

- tion involving three cysteine residues in a family with typical CADASIL. *Neurology*. 2001; 57: 1714-1717.
67. Campbell ID, Bork P. Epidermal Growth Factor-like module. *Curr Opin Struct Biol*. 1993; 385-392.
 68. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, et al. Notch3 mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. *Ann NY Acad Sci*. 1997; 826: 213-217.
 69. 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: 280-285.
 70. Federico A, Bianchi S, Dotti MT. The spectrum of mutations for CADASIL diagnosis. *Neurol Sci*. 2005; 26: 117-24.
 71. Ungaro C, Mazzei R, Conforti FL, Sprovieri T, Servillo P, et al. CADASIL: Extended Polymorphisms and Mutational Analysis of the NOTCH3 Gene. *J Neurosci Res*. 2009; 87: 1162-1167.
 72. Markus HS, Martin RJ, Simpson MA, et al. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology*. 2002; 59: 1134-1138.
 73. Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Batail, et al. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest*. 2000; 105: 597-605.
 74. Kalaria RN, Low WC, Oakley AE, Slade JY, Ince PG, Morris CM, Mizuno T. CADASIL and genetics of cerebral ischaemia. *J Neural Transm*. 2002; (Suppl.) 63: 75-90.
 75. Gridley T. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet*. 2003; 12 Spec No 1: R9-13.
 76. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009; 137: 216-233.
 77. Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, et al. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev*. 2004; 18: 2730-2735.
 78. Fouillade C, Monet-Leprêtre M, Baron-Menguy C, Joutel A. Notch signalling in smooth muscle cells during development and disease. *Cardiovasc Res*. 2012; 95: 138-146.
 79. Prakash N, Hansson E, Betsholtz C, Mitsiadis T, Lendahl U. Mouse Notch 3 expression in the pre- and postnatal brain: relationship to the stroke and dementia syndrome CADASIL. *Exp Cell Res*. 2002; 278: 31-44.
 80. Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, Maciazek J, Limol S, 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: 329-342.
 81. Gridley T. Notch signaling during vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 5377-5378.
 82. Iso T, Hamamori Y, Keddes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 543-553.
 83. 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*. 200; 108: 1614.
 84. Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet*. 1997; 16: 243-251.
 85. Oda T, Elkahoulou AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, et al. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*. 1997; 16: 235-242.
 86. Simpson MA, Irving MD, Asilmaz E, Gray MJ, Dafou D, et al. Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nat Genet*. 2011; 43: 303-305.
 87. Fischer DF, van Dijk R, Sluijs JA, Nair SM, Rachi M, et al. Activation of the Notch pathway in Down syndrome: cross-talk of Notch and APP. *FASEB J*. 2005; 19: 1451-1445.
 88. Marchesi VT. Alzheimer's disease and CADASIL are heritable, adult-onset dementias that both involve damaged small blood vessels. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71: 949-955.
 89. Razvi SS, Davidson R, Bone I, Muir KW. Is inadequate family history a barrier to diagnosis in CADASIL? *Acta Neurol Scand*. 2005; 112: 323-326.
 90. Lesnik-Oberstein SAJ. Diagnostic strategies in CADASIL. *Neurology*. 2003; 60: 2019-2020.
 91. Weller M, Dichgans J, Klockgether T. Acetazolamide responsive migraine in CADASIL. *Neurology*. 1998; 50: 1505.
 92. Forteza AM, Brozman B, Rabinstein AA, Romano JG, Bradley WG. Acetazolamide for the treatment of migraine with aura in CADASIL. *Neurology*. 2001; 57: 2144-2145.
 93. Donnini I, Nannucci S, Valenti R, Pescini F, Bianchi S, et al. Acetazolamide for the prophylaxis of migraine in CADASIL: a preliminary experience. *J Headache Pain*. 2012; 13: 299-302.