



IMPLICACIONES DEL GEN NOTCH3 EN BIOPATOLOGIA HUMANA; REVISION BIBLIOGRAFICA. ANALISIS DE CASOS PUBLICADOS DE MUTACION DE ESTE GEN EN URUGUAY

**Grupo de trabajo: Muse, Cynthia¹; Petrone, Juan José¹; Ponce, Natasha¹;
Rabaza, Rosmary¹
Orientador: Panuncio, Ana²**

¹ Estudiante de la Facultad de Medicina, UDELAR.

² Profesor Agregado, Responsable de la UMEPAR, Departamento Anatomía Patológica, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UDELAR.

INDICE

	Página
1. RESUMEN	2
2. FUNDAMENTACION DE LA PROPUESTA	2
3. OBETIVOS	3
3.1. OBJETIVOS GENERALES DE LA REVISION BIBLIOGRAFICA	3
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
4. METODOLOGIA	3
5. REVISION Y ANALISIS	3
5.1. VIA DE SEÑALIZACION DEL GEN NOTCH3	3
5.2. CADASIL GENERALIDADES	6
5.3. ANALISIS DE LOS CASOS URUGUAYOS PUBLICADOS	11
5.3.1. CLINICA	12
5.3.2. ANTECEDENTES FAMILIARES DIRECTOS	13
5.3.3. DIAGNOSTICO POSITIVO	15
5.3.4. IMAGENOLOGIA	17
5.3.5. ULTRAESTRUCTURA	17
5.4 NOTCH3 Y SU RELACION CON LA PATOLOGIA TUMORAL	19
5.4.1 RABDOMIOSARCOMA	19
5.4.2. CANCER DE PULMON DE CELULAS NO PEQUEÑAS	20
5.4.3. CANCER DE PROSTATA	21
5.4.4. CANCER DE MAMA	22
6. CONCLUSIONES	23
7. REFERENCIAS	23

1. RESUMEN

El gen NOTCH3 pertenece a una familia de genes altamente conservados entre las especies. En conjunto constituyen la vía de señalización Notch, la cual desempeña un papel fundamental en las diferentes etapas del desarrollo celular. Involucra una gran variedad de procesos celulares incluyendo el mantenimiento de la población de Stem Cell, determinación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis. Mutaciones en dicho gen, se vinculan con la etiopatogenia de enfermedades humanas tales como CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy). Se trata de un desorden neurológico infradiagnosticado a nivel mundial, caracterizado por strokes recurrentes y demencia. Asimismo, actúa como factor protumoral ya que existen mutaciones de Notch que son carcinogénicas. Realizamos una revisión bibliográfica de la biología del gen NOTCH, su relación con diferentes tipos de cáncer y CADASIL, analizando los casos publicados en Uruguay. Si bien se cuenta con estudios pioneros que han permitido conocer la vía Notch y las consecuencias de sus alteraciones, ulteriores estudios serán necesarios para elucidar con más detalle la relación de las mutaciones del gen NOTCH con las distintas patologías.

2. FUNDAMENTACION DE LA PROPUESTA

La familia de genes NOTCH es altamente conservada entre las distintas especies. Nos resultó de interés efectuar una revisión bibliográfica, ya que dichos genes cumplen un rol ampliamente reconocido y relevante en los procesos de desarrollo embrionario, determinación, diferenciación, proliferación celular y apoptosis en la célula humana. Asimismo, se la vincula a la génesis de algunos tipos de cáncer, lo que es de especial interés dado que podría resultar un eventual blanco terapéutico. Asimismo está en la base de la patología CADASIL de relativamente reciente caracterización. Se han publicado pocos casos a nivel nacional. Efectuaremos un análisis de los mismos. Dado que es la forma genética más frecuente de accidente cerebrovascular y es infradiagnosticada, nos pareció relevante contribuir a su difusión ya que en Uruguay es accesible su diagnóstico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL DE LA REVISION

Conocer las implicancias de la vía de señalización de genes NOTCH en la génesis de enfermedades humanas.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Efectuar una síntesis del conocimiento actual sobre la vía Notch.
- Revisar las publicaciones nacionales sobre casos de CADASIL
- Especificar su relación con distintos tipos de cáncer.

4. METODOLOGIA

Se realizó una revisión bibliográfica a nivel nacional e internacional de la literatura en distintas bases de datos tales como Medline, Scielo, Biblioteca de Neurología de Hospital de Clínicas. Se solicitaron artículos científicos a la Biblioteca de la Facultad de Medicina. Los criterios de búsqueda utilizados fueron Gen Notch3, CADASIL, Notch3 and Cáncer. Al efectuar la selección de artículos, se priorizó revisiones y trabajos pioneros en CADASIL y cáncer, disponibles en nuestro medio. Asimismo, se consideró especialmente aquellos que fueran artículos actuales. A nivel Nacional se encontraron solamente dos publicaciones sobre casos de CADASIL, que fueron incluidos en la revisión.

5. REVISION Y ANALISIS

5.1. VIA DE SEÑALIZACION DEL GEN NOTCH

La vía de señalización Notch, altamente conservada entre las especies, fue originalmente identificada y estudiada en la mosca de la fruta, *Drosophila Melanogaster*. En 1914 Dexter et al publicaron la primera mutación en un gen de la familia Notch. En 1917 Morgan describió el sistema Notch por primera vez. Es en el año 1919 cuando Mohr et al caracterizaron una deficiencia funcional de la proteína Notch, que provoca la aparición de muescas (*notches*) en los bordes de las alas de *Drosophila* (1) (Fig.1).

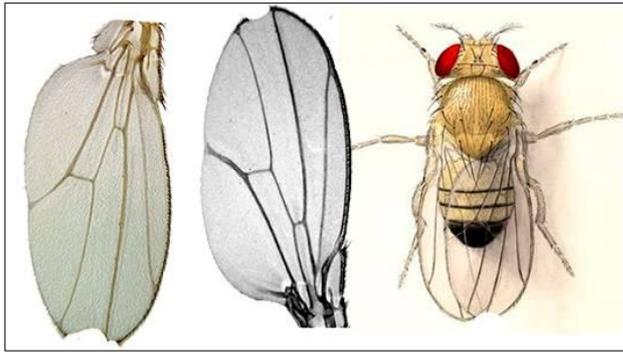


Fig.1. Muecas de las alas de *Drosophila melanogaster* deficientes de la proteína Notch.

(www.cienciaes.com/quilociencia/2014/03/09/un-siglo-de-notch/).

La vía de señalización Notch es de gran relevancia, ya que es un paso determinante en el control de eventos claves en el desarrollo de las células eucariotas. Tiene incidencia en la proliferación, control de Stem Cells, crecimiento, migración, diferenciación y muerte celular programada o apoptosis (1). Se han identificado cuatro genes de la vía Notch en distintas especies de vertebrados e invertebrados, incluyendo la especie humana. Ellos codifican las proteínas Notch 1, 2, 3 y 4. Estas son proteínas receptoras transmembranas de 300 kilodaltons (KDa) (1). El producto de cada gen representa un polipéptido precursor, pre-Notch, que posteriormente es clivado en el aparato de Golgi, dando lugar a un precursor heterodimérico. Este consta de tres porciones: una que se ancla a la membrana celular (subunidad transmembranal), una subunidad extracelular y una subunidad intracitoplasmática. La región extracelular es el principal sitio de unión con ligandos presentes en otras células. Es remarcable el hecho de que contiene varias repeticiones de secuencias de aminoácidos, similares a las encontradas en el factor de crecimiento epidérmico (EGF-simil). Cuando el receptor Notch interactúa con su ligando, el dominio intracitoplasmático es clivado proteolíticamente generando un fragmento citoplasmático (Notch-IC). Este se trasloca al núcleo, donde actúa sobre factores de transcripción de la familia CLS (Fig. 2). En algunos tipos celulares, la interacción ligando-receptor Notch hace que se disocie un complejo represor a nivel del ADN, se recluten co-activadores nucleares desencadenándose la transcripción. Existen otros tejidos que por el contrario la vía Notch inhibe la misma al activar represores. Los distintos resultados obtenidos tras la activación de la vía Notch ilustran una

variación transcripcional que depende del tipo celular y del estado de diferenciación de la célula involucrada (2).

De los genes NOTCH conocidos, únicamente NOTCH1 y NOTCH3 se han visto implicados en enfermedades humanas. NOTCH3 se ha asociado con enfermedades causadas por mutaciones en líneas germinales y NOTCH1 se ha involucrado en translocaciones en pacientes con neoplasmas de células T (3). Hasta el momento sólo se han descrito cuatro ligandos para el receptor Notch (**Jagged 1**, **Jagged 2**, **Delta-like1**, y **Delta-like3**). En forma exclusiva Jagged 1 fue relacionado con patología humana (4 y 5).

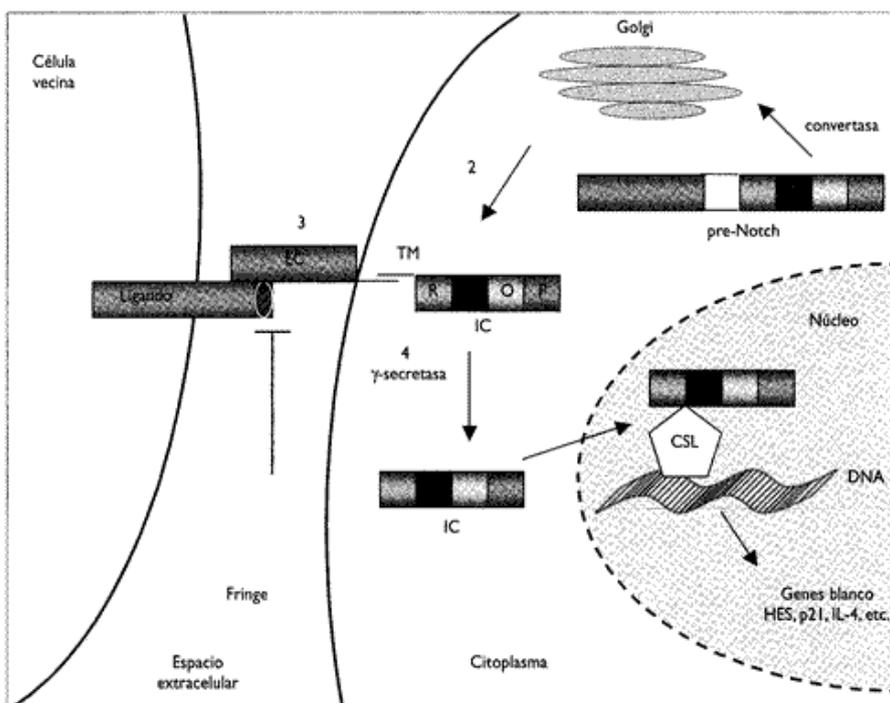


Fig. 2. Procesamiento del receptor Notch y mecanismo de acción. Pre-Notch, Polipeptido precursor de Notch; EC: subunidad extracelular; IC: subunidad intracelular; TM: subunidad transmembranal (Santos L et al 2006).

NOTCH y CADASIL. Los trabajos realizados por Joutel et al demostraron que mutaciones en el gen NOTCH3 causan la enfermedad autosómica dominante CADASIL. Se caracteriza por strokes recurrentes y demencia a edades tempranas (6 y 7). Se describen mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales a nivel de dichos genes.

NOTCH y Cáncer. Habida cuenta que de la señalización Notch dependen las decisiones del destino celular, los procesos de diferenciación y de proliferación,

resulta verosímil pensar que cualquier disregulación en esta vía puede determinar la generación de cáncer (1). Actualmente se conoce que los componentes de la vía Notch están involucrados en una gran variedad de cánceres, como Rbdomiosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, entre otros. Mencionaremos más adelante sumariamente algunas características relevantes de su papel en la génesis de dichas neoplasias.

5.2. CADASIL, GENERALIDADES

Es una enfermedad producida por la degeneración progresiva de las células musculares lisas de los pequeños vasos. La mutación gen NOTCH3 se ha encontrado en el 90% de los pacientes con dicha patología (6, 7). Las principales manifestaciones clínicas incluyen migraña, con y sin aura, infartos subcorticales recurrentes y deterioro cognitivo que conduce a una discapacidad severa y muerte prematura (8, 9, 10). Esta patología es la forma genética más frecuente de accidente cerebrovascular y demencia vascular. El primer ataque isquémico varía ampliamente entre 28 y 60 años de edad. La muerte se produce aproximadamente 20 años después de la aparición de los síntomas (11,12).

El gen responsable de la enfermedad se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 (6,13). Se expresa predominantemente en las células del musculo liso vascular, codifica una proteína transmembrana. Ella es imprescindible para la integridad estructural y funcional de las arterias, ya que controla la diferenciación de dichos vasos y la maduración de las células musculares lisas (14). NOTCH3 es un gen grande posee 33 exones que codifican una proteína de 2.321 aminoácidos. Mencionamos anteriormente que el ectodominio de esta proteína contiene repeticiones en tándem del EGF-símil. Cada secuencia repetitiva posee seis residuos de cisteína implicados en la formación de tres puentes disulfuro (7). Las mutaciones evidenciadas en CADASIL se producen generalmente en estas repeticiones, codificadas por los 23 primeros exones. La consecuencia es que originan la ganancia o pérdida de un residuo de cisteína, con la subsecuente alteración del patrón de puentes

disulfuro de la repetición del EGF mutada (15,16). La versión anormal de la proteína Notch3 se acumula en la membrana plasmática de las células musculares lisas de pequeñas arterias y capilares, provocando su degeneración y consiguiente pérdida de funcionalidad.

Diagnóstico. Se inicia con la sospecha clínica de CADASIL, especialmente en pacientes jóvenes, sin factores de riesgo cardiovascular, que presentan eventos isquémicos reiterados o demencia de tipo subcortical, con historia familiar de este tipo de patologías. Los hallazgos imagenológicos son de gran importancia diagnóstica, principalmente la resonancia nuclear magnética (RNM) que detecta en 100% de los casos alteraciones de la sustancia blanca. Todos los pacientes portadores desarrollarán la enfermedad clínica antes de los 60 años e incluso tendrán alteraciones imagenológicas (leucoencefalopatía) antes de los 35 años. Después de esta edad, si la RNM cerebral es normal, es poco probable que se desarrolle la enfermedad. La histopatología de CADASIL muestra una angiopatía no aterosclerótica, no amiloide, con la acumulación de material granular electrondenso, que se ubica dentro de las membranas basales de las células musculares lisas y la matriz extracelular (17). Antes se pensaba que era osmiofílica; actualmente se ha demostrado que sin osmio igualmente los depósitos son electrondensos (18). La presencia de depósitos granulares electrondensos en el análisis ultraestructural de biopsias de piel son diagnósticos, si bien los falsos-negativos no lo descartan, ya que las lesiones son parcheadas. Sin embargo, con un muestreo a nivel del dermis medio y o profundo, se encuentran con mucha frecuencia las lesiones características en los vasos arteriales pequeños. El estudio de Biología Molecular identifica la mutación implicada en el gen NOTCH3 permitiendo asimismo el diagnóstico previo a la aparición de signos o síntomas, al igual que la ultraestructura de la biopsia de piel (19). Una vez identificada la mutación, es posible el estudio puntual de la misma en los integrantes de la familia con riesgo de ser portadores (20).

Tratamiento. Hasta el momento no hay estrategias específicas de prevención y tratamiento de CADASIL. De todas formas, es de gran importancia su

diagnóstico precoz para el asesoramiento genético a los integrantes de la familia.

Nos parece relevante describir a continuación un estudio pionero que realizó Joutel et al, donde constata la acumulación del ectodominio del gen NOTCH3, dentro de la vasculatura cerebral de pacientes con CADASIL (21). Se analizó el patrón de expresión de NOTCH3 en diversos tejidos humanos. Las muestras control se obtuvieron de diferentes parénquimas provenientes de autopsias (10) y en cirugías (3). Las muestras con CADASIL fueron de autopsias de tejido cerebral (8) y de cirugía (1). Se estudiaron con hibridación in situ, se generaron anticuerpos específicos para Notch3, Inmunohistoquímica, Western Blot, PCR y microscopía electrónica. La expresión de NOTCH3 se detectó exclusivamente en los vasos dentro de los diversos parénquimas, y principalmente en la capa de células del músculo liso (Fig.3) La inmunomarcación para músculo liso, miosina, epítipo de Notch3 1E4 y 2E11 y células vasculares endoteliales en secciones de lóbulo frontal, demostró que los anticuerpos anti-Notch3 marcaron exclusivamente las células musculares lisas (Fig.3o y 3q).

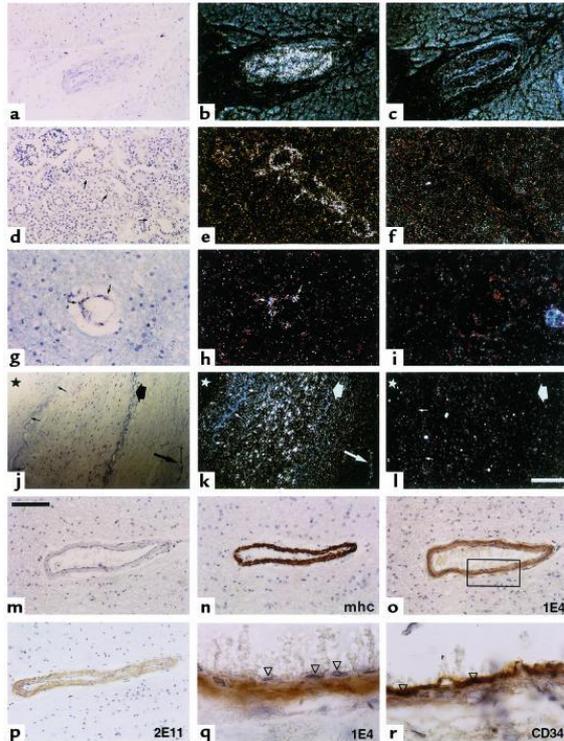


Fig. 3. Expresión de Notch3 en diversos parénquimas.

Secciones de miocardio (a-c), renales (d-f), sustancia blanca cerebral (g-i), de la arteria renal (j-l), cadenas pesadas de miosina (mhc) (n), epítipo extracelular de Notch3 1E4 (o y q) y 2E11 (p) células vasculares endoteliales marcadoras CD34 (r) Notch3 se detecta exclusivamente en los vasos (flechas).

Confirmación de depósito anormal del receptor Notch3.

Los anticuerpos anti-Notch3 contra epítomos extracelulares mostraron una inmunorreactividad intensa y granular en células musculares lisas de cerebros con CADASIL (Fig. 4, b, d, f, y h) en contraste con la tinción débil y homogénea en cerebros de control (Fig. 4, a, c, e, g). Esta intensa inmunorreactividad de Notch3 se observó en todos los vasos, incluyendo arterias, venas y capilares en todo el parénquima cerebral con CADASIL. Se detectó tanto en células musculares lisas vasculares (Fig. 4, b, d, y f) como así también en pericitos (Fig. 4, h, flechas).

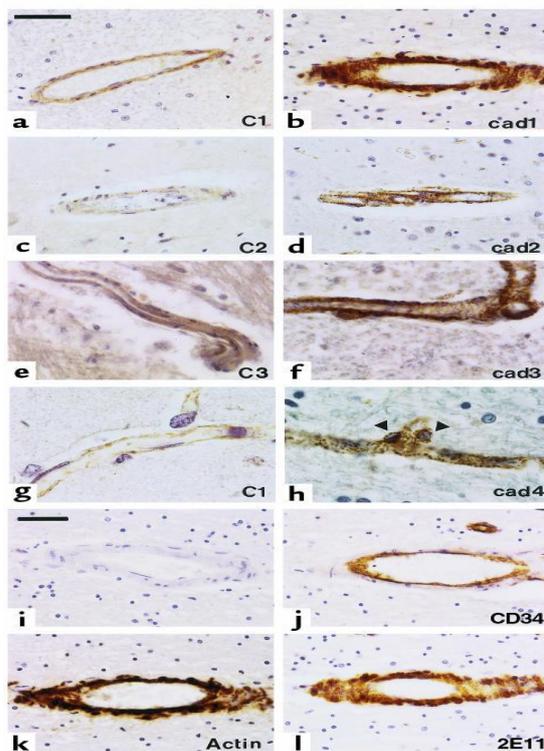


Fig. 4. Inmunomarcación de Notch3 en cerebros control y con CADASIL.

Secciones de parafina de control (a, c, e, y g) y cerebros con CADASIL (b, d, f, y h) incluyendo secciones de la sustancia blanca (a y b), corteza (c, d, g, y h), y tronco cerebral (e y f), se marcaron con el anticuerpo anti-Notch3 1E4.

Se obtuvieron diferencias entre los patrones de inmunotinción con los anticuerpos anti-Notch3 intracelulares y extracelulares, planteándose la posibilidad de que Notch3 sufre una escisión proteolítica, debido a que las arterias expresaron el fragmento de 210KDa y los fragmentos de 97KDa, pero no la proteína de longitud completa 280KDa. Se observó una acumulación dramática y selectiva del producto de escisión de 210-kDa correspondiente al ectodominio Notch3 en pacientes con CADASIL.

A efectos de identificar el compartimiento intracelular donde se acumula Notch3, se marcó dicha proteína con oro coloidal, realizándose inmunomicroscopía electrónica en muestras de cerebro provenientes de un paciente portador de CADASIL. La inmunomarcación se restringió a pequeñas zonas de la membrana plasmática de las células musculares lisas, en la vecindad de los depósitos electrodensos granulares, pero no en el interior de éstos.

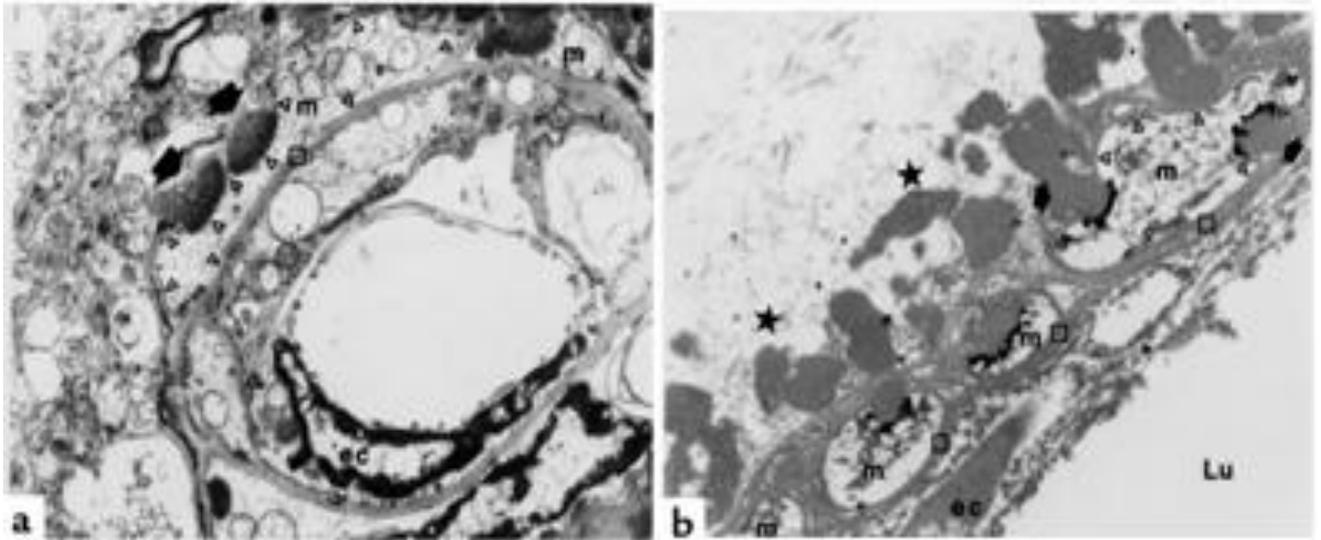


Fig.5. Microscopía electrónica. Paciente con CADASIL. (a) Vaso del lóbulo frontal con depósitos granulares electrodensos (flechas grandes) en estrecho contacto con la membrana citoplasmática de la célula muscular lisa. (b) Inmunomicroscopía electrónica con el anticuerpo 1E4. Depósitos granulares electrodensos (flechas grandes) anidados en invaginaciones de células musculares lisas (m), o bien se extienden muy lejos dentro de la pared del vaso (estrellas). Las esferas de oro coloidal que inmunomarcan Notch3 se observan como puntos negros. Se agrupan considerablemente en la membrana de células musculares lisas (pequeñas flechas) estrechamente dispuestas alrededor de los depósitos.

Esta acumulación se produce en la membrana citoplasmática de las células musculares lisas vasculares y pericitos. Este fenómeno puede explicarse por aumento de la producción de Notch3, o en su defecto por alteración en el clearance de este receptor de la superficie celular. Debido a que las cantidades de ARN mensajero de Notch3 que eran esencialmente idénticas en CADASIL y los individuos de control, parece poco probable la primera posibilidad. La oligomerización inadecuada del ectodominio de Notch3 mutante, fuertemente sugerido por datos recabados, probablemente contribuye a su eliminación deteriorada.

Es de gran relevancia a efectos diagnósticos los hallazgos del mismo equipo que indican la acumulación de Notch3 en muchos otros tejidos, incluyendo el músculo y la piel. Esto permitió el uso de biopsias de piel en lugar de cerebro o músculo.

Los resultados analizados indican que las células musculares lisas vasculares son el blanco principal en la cascada de eventos producidos por mutaciones Notch3 en CADASIL.

5.3. ANALISIS DE CASOS URUGUAYOS PUBLICADOS DE CADASIL

La incidencia de CADASIL (enfermedad autosómica dominante) es desconocida a nivel nacional y mundial. En el año 1998 se realizó el diagnóstico clínico de la primera familia con CADASIL en Latinoamérica. En 2008 Vaglio, et al. comunicaron la existencia de una nueva familia uruguaya con CADASIL, cuyo diagnóstico fue clínico, ultraestructural, y de Biología Molecular (22). Analizaron casos clínicos correspondientes a 3 integrantes de una familia: 2 hermanos y la madre (Fig. 6).

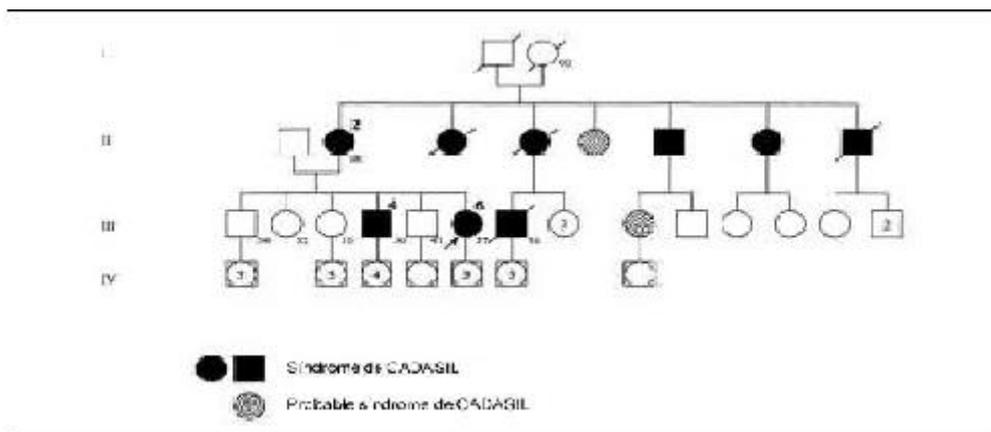


Fig. 6. Genealogía de la familia.

Posteriormente, se comunicaron 3 pacientes con historia clínica, RNM y biopsia de piel (23). Desde el año 2008 a la fecha se han diagnosticado nuevos casos de CADASIL en nuestro medio, principalmente en los últimos 2 años, cuyos datos no han sido publicados aún.

5.3.1. CLINICA

A continuación presentamos una tabla comparativa donde se sintetizan los seis casos antes mencionados, con sus respectivos síntomas y signos al debut de la enfermedad. Se resume la presentación clínica y se comparan las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad (Tabla 1).

Año de publicación	2008			2013		
	1 (propósito)	2 (madre)	3 (hermano)	4	5	6
Paciente	1 (propósito)	2 (madre)	3 (hermano)	4	5	6
Sexo	F	F	M	F	M	M
Edad	35	67	49	59	61	37
Vértigos posicionales	X					
Migraña con y sin aura	X					
Afasia	X					
Hemiparesia	X		X			
ACV/Isquémicos reiterados		X	X			
Cuadriparesia		X	X			
Deterioro cognitivo de tipo demencia subcortical		X	X	X	X	X
Disartria			X			
Trastornos psicológicos (depression, irritabilidad, etc)			X			X
Trastornos de la memoria				X	X	
Trastornos psicoconductuales (retracción social, apatía)					X	X
Trastorno de la marcha			X			X
Trastorno esfinteriano						X

Tabla 1. Presentación clínica al debut de la enfermedad

Teniendo en cuenta los datos presentados en la tabla 1 se concluye que:

- La edad de diagnóstico de CADASIL fue variable entre los 35 y 67 años. La media general fue de 51 años. La edad promedio para el sexo femenino fue de 53 años y 49 para el sexo masculino.
- La frecuencia de la enfermedad fue igual para ambos sexos en los casos examinados.
- Todos los pacientes evidenciaron afectación de la esfera neurológica, con un grado variable de severidad.
- La presentación clínica más frecuente fue deterioro cognitivo de tipo demencia subcortical (83% de los pacientes analizados).
- Los siguientes síntomas se presentaron con una frecuencia de 33,3% cada uno: hemiparesia, cuadriparesia, ACV isquémicos reiterados, trastornos psicológicos, trastornos de la memoria, trastornos psicoconductuales y de la marcha. Luego con una frecuencia de 16,6% encontramos: vértigos posicionales, migraña con y sin aura, afasia, disartria y trastornos esfinterianos.
- La presentación clínica de CADASIL fue variable incluso dentro de pacientes de una misma familia, como ocurrió en los casos 1, 2 y 3.
- Comparando la clínica de la casuística uruguaya con los publicados a nivel internacional encontramos que las características analizadas son coincidentes.

5.3.2. ANTECEDENTES FAMILIARES DIRECTOS

Dado que CADASIL es una enfermedad autosómica dominante analizamos los antecedentes familiares, que se presentan en la Tabla 2:

ANTECEDENTES FAMILIARES DIRECTOS						
Paciente	1	2	3	4	5	6
ACV isquémicos	X		X			
Esclerosis múltiple	X		X			
Demencia				X		
Enfermedad neurológica degenerativa					X	
Esquizofrenia					X	
AF desconocidos		X				X

Tabla 2. Antecedentes familiares.

Podemos concluir que:

- Todos los pacientes cuyos antecedentes familiares son conocidos, presentaron familiares directos con afectación de la esfera neurológica de severidad variable.

- Los antecedentes que con mayor frecuencia observados fueron los ACV isquémicos y la Esclerosis Múltiple. En cuanto a ésta última nos cuestionamos si realmente fue un diagnóstico correcto ya que para ese entonces no se conocía CADASIL.
- La constatación de alteraciones correspondientes con CADASIL en varios miembros de una misma familia es concordante con el patrón de herencia autosómica dominante descrito.
- Como consecuencia de lo expuesto anteriormente se destaca la importancia de la realización de un screening familiar a efectos de obtener un diagnóstico precoz, dado la frecuencia de síntomas neurológicos en familiares directos de los pacientes afectados.

5.3.3. DIAGNOSTICO POSITIVO

El diagnóstico de certeza de CADASIL requiere la realización de estudios paraclínicos. Los cuatro pilares diagnósticos son: la clínica sugestiva, imagenología, biopsia de piel y/o músculo y estudio de genética molecular. Los estudios disponibles en nuestro medio son la RNM y la Microscopía Electrónica de piel. La biopsia de músculo es de una mayor invasividad, no siendo necesaria dado que los hallazgos de la biopsia de piel en general son suficientes.

Los hallazgos de estos estudios se presentan en la Tabla 3.

HALLAZGOS PARACLINICOS							
	Paciente	1	2	3	4	5	6
Imagenología	Hiperintensidad en sustancia blanca periventricular	X	X				
	RNM						X
	Microhemorragias						X
	Múltiples infartos subcorticales	X	X	X			X
	Hiperintensidad en porción anterior de lóbulos temporales				X		X
Biopsia de piel y músculo	Material granular electrodensos	X	X	X	X	X	X
	Células musculares lisas degenerativas	X		X	X		X
Estudio genético	Mutación en Gen Notch 3, exón 5	X					

Tabla 3. Hallazgos paraclínicos

5.3.4. IMAGENOLOGIA

En el estudio de RNM del paciente 1 (Fig. 7-A) se observan pequeñas imágenes hipointensas en T1, hiperintensas en T2, siendo más destacadas en Fast-Flair exclusivamente en la sustancia blanca hemisférica predominantemente periventricular. Hay también compromiso multifocal de la sustancia blanca periventricular de los hemisferios cerebrales.

En el caso 3 (Fig. 7-B) se observan múltiples lesiones isquémicas lacunares gangliobasales, subcorticales y leucoencefalopatía marcada.

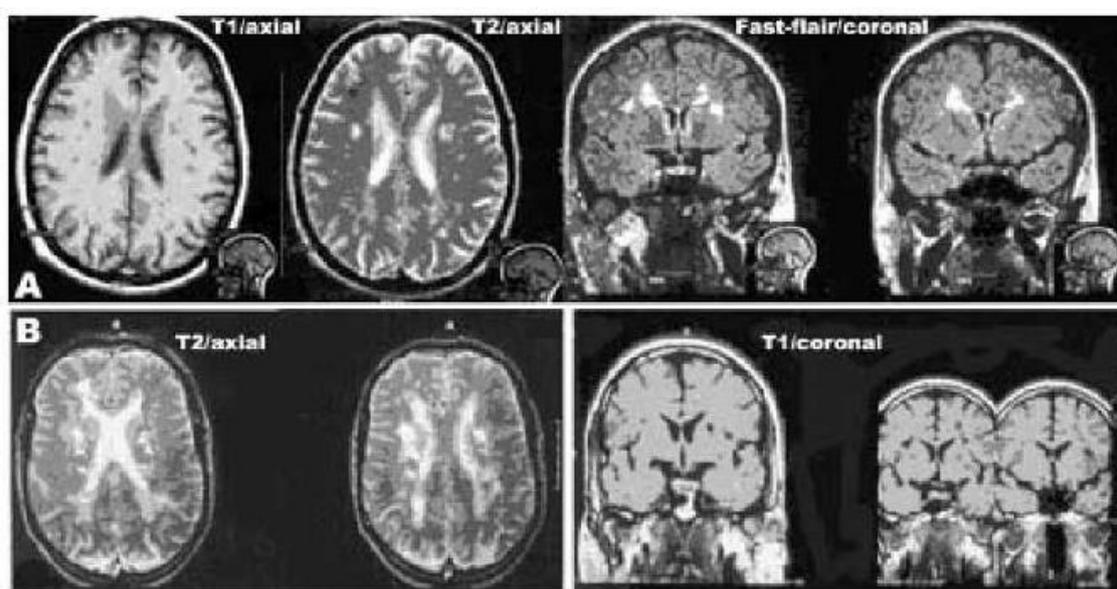


Fig. 7. A) RNM correspondiente al paciente 1. B) RNM del paciente 3. (Revista Médica del Uruguay vol.24 n°.1 Montevideo marzo 2008).

5.3.5. ULTRAESTRUCTURA

En la figura 8, se presentan arteriolas correspondientes a los casos 1 y 2 respectivamente. En la figura 8-A se observa una arteriola de piel del individuo 1, presenta depósitos granulares electrondensos (señalados con flechas) asociados a pequeñas indentaciones de las células musculares lisas. En la figura 8-B se observa el mismo sector a mayor aumento, hay células musculares lisas con signos de degeneración, las flechas señalan los depósitos electrondensos en las escotaduras de las células. La imagen (C) corresponde a

una biopsia de músculo del paciente 3, hay depósitos granulares electrondensos en las células musculares lisas arteriolares.

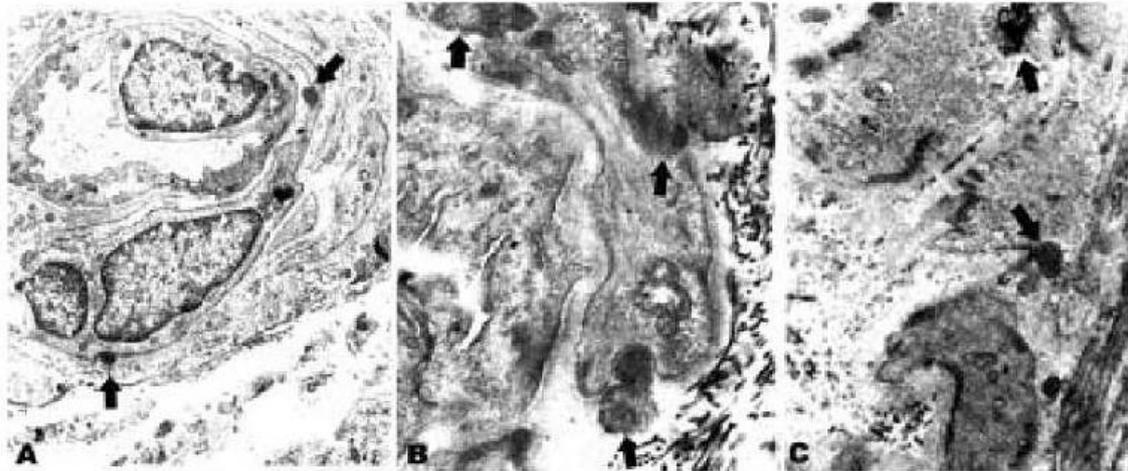


Fig. 8. Microscopía electrónica de biopsia de piel de los pacientes 1 y 3.

(Vaglio et al 2008).

Finalmente, con respecto a la paraclínica en estos pacientes podemos concluir:

- Todos los pacientes estudiados presentaron en ultraestructura depósitos de material granular electrondenso, y cuatro de ellos presentaron a su vez degeneración en las células musculares lisas. Debido a su alta efectividad en el diagnóstico de CADASIL, la biopsia de piel es el estudio de elección en nuestro medio.
- En cuanto a la RNM el hallazgo más común fue la existencia de múltiples infartos subcorticales, seguida en frecuencia por la presencia de hiperintensidad en la sustancia blanca periventricular, e hiperintensidad en la porción anterior de los lóbulos temporales.
- El estudio genético fue realizado en uno de los seis pacientes, en él se encontró una mutación en el exón 5 del gen Notch3, donde una timina en la posición 830 es sustituida por una adenina. En su momento, fue una mutación que no había sido descrita a nivel mundial.

5.4. NOTCH3 Y SU RELACION CON LA PATOLOGIA TUMORAL

Como se mencionó anteriormente, la mutación de este gen y las alteraciones en su regulación están relacionadas con la génesis, progresión y diseminación de la patología tumoral. A continuación haremos referencia a diferentes neoplasias y la vinculación con alteraciones del gen NOTCH3.

5.4.1. RABDOMIOSARCOMA (RMS)

Es una de neoplasia de músculo esquelético que se presenta con mayor incidencia en la infancia. Es de baja frecuencia ya que representa del 7% al 8% de las neoplasias en niños. El RMS pediátrico presenta dos tipos histológicos: embrionario y alveolar (24; 25).

La vía Notch al igual que en otros tejidos, es uno de los principales reguladores del desarrollo del músculo esquelético. Juega un papel esencial en el balance entre la proliferación y diferenciación de la célula muscular lisa (26). Específicamente Notch1 regula la proliferación y la autorenovación de precursores miogénicos, mediante su activación (27-31). Por su parte NOTCH3 induce la dediferenciación de los mioblastos y previene la diferenciación miogénica (32). Al bloquearse la vía Notch se inhibe la proliferación, migración e invasión de células tumorales (33-37). Recientemente se ha demostrado una disregulación inhibitoria de esta vía en el RMS. La inhibición de Notch3 impide la diferenciación celular en ambos tipos de RMS pediátricos. Este fenómeno se debe a la inducción de NOTCH3 dependiente de HES1. HES1 es un factor de transcripción de la familia hélice-loop-hélice. Actúa reprimiendo la transcripción influyendo en la proliferación y diferenciación celular. Así mismo se ha reportado que al inhibir Notch3 en el RMS alveolar-PAX3 FOX1, se ha logrado obstaculizar el crecimiento celular de dicho tumor in vivo (33; 35).

Teniendo en cuenta que la activación de NOTCH3 amplifica el potencial de proliferación de las células de RMS, in vivo e in vitro, existe la posibilidad que ciertos RMS alveolares se beneficiasen de la inhibición de NOTCH3, constituyéndose en una posibilidad terapéutica a explorar (38).

5.4.2. CANCER DE PULMON DE CELULAS NO PEQUEÑAS (CPCNP)

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. De acuerdo a la Clasificación de la OMS hay 2 grandes tipos histológicos: carcinomas de células pequeñas y de células no pequeñas. Este último comprende cerca del 85% de los cánceres de pulmón.

Las fallas en el funcionamiento de las vías Notch y Wnt, son de suma importancia para el desarrollo y la progresión del CPCNP (39, 40). Ambas vías favorecen la proliferación y la supervivencia de las células tumorales (41). Se ha demostrado que la sobre-expresión de NOTCH3 se encuentra presente en el 40% de los CPCNP, y aún es más interesante que el bloqueo del mismo hace que se pierda el fenotipo maligno in vitro e in vivo (42).

Se postula que la familia de **genes Fringe** está relacionada a este tipo de cáncer. Está compuesta en mamíferos por tres genes, **Manic Fringe**, **Lunatic Fringe** y **Radical Fringe**. Ellos codifican una transferasa (β 1,3-GlcNac-fucosa específica), utilizando como sustrato uridina difosfato de N-acetilglucosamina.

Se piensa que solo el gen **Manic Fringe** está relacionado con el cáncer de pulmón. Este gen también ha sido asociado al cáncer de cuello uterino provocado por el Virus del Papiloma Humano (43). Veremos más adelante que **Lunatic fringe** se relaciona también con el cáncer de mama (44) y al cáncer de próstata.

Manic Fringe se ubica en el cromosoma 22q13.1. Esta región es eliminada por delección en el cáncer de pulmón (45, 46). La proteína Manic Fringe reduce la estabilidad de la proteína Notch3, así como la proliferación y el crecimiento tumoral, por lo que se sostiene que Manic Fringe es un supresor tumoral en el cáncer pulmonar (47). Esta acción se debe a la supresión de la señalización mediada por el ligando antes mencionado, Jagged1. Se bloquea la interacción entre Notch3 y Jagged 1. Manic Fringe disminuye el nivel de Notch3 mediante la degradación a través de una vía mediada por proteosomas (47).

Estos hallazgos nos llevan a pensar si es posible lograr un eventual tratamiento, basado en la regulación de Manic Fringe. Asimismo, sería de interés la posibilidad de lograr un screening de la delección de este gen Fringe, en pacientes con factores de riesgo para cáncer de pulmón, al igual que estudios basados en Notch y sus proteínas regulatorias permitiendo conocer la agresividad y proyectar un pronóstico en este tipo de cáncer.

5.4.3. CANCER DE PROSTATA

Es el cáncer más frecuente en hombres. La familia Notch es un importante regulador de la diferenciación y proliferación también en la próstata. La inhibición de la vía Notch conduce a la pérdida de células progenitoras epiteliales y la disminución de la proliferación celular. Ha sido demostrado en ratones que, la señalización Notch logra suprimir la proliferación y expansión de células madres basales durante la regeneración del tejido prostático (48-52). Dichas células pluripotenciales se las vincula en la actualidad en la génesis del cáncer de próstata (53, 54).

El gen **Lunatic Fringe** se expresa en el epitelio basal de las células prostáticas (52). Notch regula la proliferación y diferenciación de dichas células. Lunatic Fringe controlaría la activación de Notch. La modulación de Notch por Lunatic Fringe podría desempeñar un papel crítico en la generación y progresión tumoral. La deficiencia de este gen incidiría en la carcinogénesis, debido a que favorecería la expansión de células madres y progenitoras dependientes de Notch.

La posibilidad de que Lunatic Fringe funcione como supresor tumoral modulando la vía Notch, es sustentada por la existencia de una correlación negativa entre la expresión de dicho gen y la escala de Gleason usada en la estadificación histológica del cáncer de próstata. Estudios en ratones y en células humanas avalan este fenómeno; mostrando que Lunatic Fringe puede inhibir la carcinogénesis mediante el bloqueo de la iniciación de la expansión de células basales (55).

5.4.4. CANCER DE MAMA

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en el sexo femenino. La gran mayoría de éstas; sobre todo las pobremente diferenciadas; se piensa actualmente que derivan de células progenitoras luminales (56, 57).

Recientemente se ha descrito un orden celular jerárquico en el epitelio mamario. Las células madres (Stem Cell) son células luminales (58-61). Asimismo se constató la existencia de dos poblaciones diferentes de Stem Cells, una para cada compartimento de la bicapa ductal. Ellas solo originan células del compartimento al que pertenecen (62). Notch modula esta diferenciación al “unificar” o sincronizar los destinos celulares de las células vecinas, mediante la comunicación transmembrana receptor-ligando. Notch3 se encuentra asociado al mantenimiento de la quiescencia de células madre en varios tejidos (63-67). En la glándula mamaria se expresa en las células luminales.

Se ha encontrado que Notch3 se ve implicado en la regulación de Stem cell en varios tejidos desde el intestino y más recientemente la glándula mamaria. Las Stem Cell luminales originan células progenitoras, estas expresan Notch3, el cual diferencia las células con alta capacidad de multiplicación, y células quiescentes. Este gen se expresa en las células altamente clonogénicas que se encuentran en estado no proliferativo, pero pueden ser activadas en el desarrollo de la glándula. Estas pueden sobrevivir varios ciclos embarazo-involución, dando lugar al linaje de células luminales. La vía Notch se ha vinculado con el desarrollo de la glándula mamaria, al igual que con la tumorigenesis de ella. Específicamente la sobre-expresión de Notch se relaciona con el cáncer de mama altamente agresivo “triple negativo o triple resistente” humano (resistente a las terapias con estrógenos, progestágenos y Her2Neu) (66).

6. CONCLUSIONES

El gen NOTCH3 desempeña numerosas funciones esenciales para un normal funcionamiento de la célula. Alteraciones tanto en el gen como en la regulación de su expresión están en la base de múltiples patologías humanas.

Es conocida su asociación con la enfermedad autosómica dominante CADASIL, de incidencia desconocida e infradiagnosticada a nivel nacional y mundial. En nuestro medio se cuenta con el reporte de seis casos. Es accesible al diagnóstico cuando la clínica es sugestiva, mediante estudio ultraestructural de biopsia de piel. Es cada vez mayor el número de casos en los que es posible efectuar diagnóstico por este método. Ulteriores estudios moleculares serán necesarios para caracterizar las alteraciones genéticas involucradas.

La carcinogénesis se asocia a alteraciones de la vía de señalización por mutaciones u otras alteraciones en el gen NOTCH. Lo que es de mayor significación, en ciertos tipos de cáncer la mutación de este gen se asocia a mal pronóstico.

Se cuenta con literatura sobre el gen NOTCH3, y su relación con diversas enfermedades como CADASIL y cáncer, aun queda mucho por conocer, serán necesarios ulteriores estudios los que se traducirán en mejores tratamientos y pronósticos de las enfermedades que ocasiona.

7. REFERENCIAS

1. Santos L, León-Galván MF, Marino-Marmolejo EN. Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud Publica Mex* 2006; 48:155-165.
2. Eric J Allenspach, Ivan Maillard, Jon C Aster, Warren S Pear. Notch Signaling in Cancer, *Cancer Biology & Therapy* 2002; 1:5, 466-476.
3. Ellison LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD , et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila Notch* gene, is broken

by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 1991. **66**:649-661.

4. Li L1, 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.

5. Oda T1, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, et al, Mutations in the human *Jagged1* gene are responsible for Alagille syndrome. Nat Genet 1997. **16**:235-242.

6. 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**:707-710.

7. Joutel A1, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssière C, et al., Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. Lancet 1997. **350**:1511-1515.

8. Chabriat H, Vahedi K, Iba-Zizen MT, Joutel Un, Nibbio Un, Nagy TG, et al. El espectro clínico de CADASIL: un estudio de siete familias. 1995. Lancet 346: 934-9.

9. Dichgans JF, Barrio R, del Arco A, Garcia-Bellido Un. La caracterización genética y molecular de una mutacion de Notch en su dominio de Delta y Serrate de unión en Drosophila. 1993. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90: 4037-41.

10. Opherk C, Peters N, Herzog J, Luedtke R, Dichgans M. La prevision a largo plazo y las causas de muerste en CADASIL, un studio retrospective en 411 pacientes. 2004. Cerebro 127: 2533-9.

11. Glusker P, Horoupian DS, Lane B. Familial arteriopathic leukoencephalopathy : imaging and neuropathologic findings. AJNR Am J Neuroradiol 1998; 19(3): 469-75

12. Kalimo H, Viitanen M, Amberla K, Juvonen V, Marttila R, Pöyhönen M, et al. CADASIL: hereditary disease of arteries causing brain infarcts and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25(4): 257-65.
13. 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(3): 256-9.
14. Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, et al. El ectodominio del receptor Notch se acumula dentro de la vasculatura cerebral en pacientes CADASIL. 2000. *J Clin Invest* 105: 597-605
15. Joutel A, Monet M, Domenga V, Riant F, Tournier-Lasserre E. Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signalling pathway. *Am J Hum Genet* 2004; 74(2): 338-47
16. Vikelis M, Papatriantafyllou J, Karageorgiou CE. A novel CADASIL causing mutation in a stroke patient. *Swiss Med Wkly* 2007, 137(21-22): 323-5.
17. Ruchoux MM, Maurage CA. CADASIL: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Neuropathol J Exp Neurol* 1997; 56:947-64.
18. Iglesias M, Jimeno M, García M, Mon D, Roquer J, Alameda F, et al. CADASIL electron-dense deposits are not osmiophilic. Report of a non-familial case. Handout of ULTRAPATH, 12th. Conference on Diagnostic Electron Microscopy with Surgical, Clinical, and Molecular Pathology Correlations Barcelona, Spain July 11-16, 2004.

19. 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(11): 2291-2.
20. Ishida C, Sakajiri K, Yoshita M, Joutel A, Cave-Riant F, Yamada M. CADASIL with a novel mutation in exon 7 of NOTCH3 (C388Y). *Intern Med* 2006; 45(16): 981-5
21. Anne Joutel, Frédéric Andreux, Swann Gaulis, Valérie Domenga, Michaëlle Cecillon, Nicole Battail, et al. El ectodominio del receptor Notch3 se acumula dentro de la vasculatura cerebral de pacientes con CADASIL. *J Clin Invest.* 2000. 105 (5): 597-605.
22. Vaglio A, Ferreira M, Panuncio A, Castagnola M, Pebet M, De la Peña S, Quadrelli R, CADASIL: comunicación de una familia uruguaya con definición clínica, imagenológica, anatomopatológica y genética molecular, *Revista Médica del Uruguay*, vol.4, número 1, Montevideo, marzo 2008.
23. Rivero R, Preve F, Gómez F, Lombardo D, Legnani M, Monti S, Gaye A, Perna A, Salamano R, Panuncio A, Ceroni K, CADASIL: causa más frecuente de ACV y demencia vascular hereditaria en adultos (2014) *Revista Opción Médica del Uruguay*,42:
24. Loeb DM, Thornton K, Shokek O (2008) Pediatric soft tissue sarcomas. *Surg Clin North Am* 88: 615–627.
25. Parham DM, Ellison DA (2006) Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. *Arch Pathol Lab Med* 130: 1454–1465.
26. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770–776.

27. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302: 1575–1577.
28. Sun H, Li L, Vercherat C, Gulbagci NT, Acharjee S, Li J, et al. (2007) Stra13 regulates satellite cell activation by antagonizing Notch signaling. *J Cell Biol* 177:647–657.
29. Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T. (1999) Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* 274: 7238–7244.
30. Buas MF, Kabak S, Kadesch T (2010) The Notch effector Hey1 associates with myogenic target genes to repress myogenesis. *J Biol Chem* 285: 1249–1258.
31. Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S. (2012) Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol* 32: 2300–2311.
32. Gagan J, Dey BK, Layer R, Yan Z, Dutta A (2012) Notch3 and Mef2c proteins are mutually antagonistic via Mkp1 protein and miR-1/206 microRNAs in differentiating myoblasts. *J Biol Chem* 287: 40360–40370.
33. Sang L, Collier HA, Roberts JM (2008) Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science* 321: 1095–1100.
34. Roma J, Masia A, Reventos J, Sanchez de Toledo J, Gallego S (2011) Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro. *Clin Cancer Res* 17: 505–513.
35. Raimondi L, Ciarapica R, De Salvo M, Verginelli F, Gueguen M, Martin C, et al. (2012) Inhibition of Notch3 signalling induces rhabdomyosarcoma cell differentiation promoting p38 phosphorylation

and p21(Cip1) expression and hampers tumour cell growth in vitro and in vivo. *Cell Death Differ* 19: 871–881.

36. Nagao H, Setoguchi T, Kitamoto S, Ishidou Y, Nagano S, Yocouchi M, et al. (2012) RBPJ is a novel target for rhabdomyosarcoma therapy. *PLoS One* 7: e39268.

37. Belyea BC, Naini S, Bentley RC, Linardic CM (2012) Inhibition of the Notch-Hey1 axis blocks embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis. *Clin Cáncer Res* 17: 7324–7336

38. Maria De Salvo, Lavinia Raimondi, Vella S, Adesso L, Ciarapica R, Verginelli F, et al. (2014). Hyper-Activation of Notch3 Amplifies the Proliferative Potential of Rhabdomyosarcoma Cells. *PLoS One* 9(5): e96238.

39. Katoh M, Katoh M (2006) NUMB is a break of WNT-Notch signaling cycle. *Int J Mol Med* 18: 517-521.

40. Bertrand FE, Angus CW, Partis WJ, Sigounas G (2012) Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle* 11: 4344-4351.

41. Chunyan Li, Zhang S, Lu Y, Zhang Y, Wang E, Cui Z. (2013). The Roles of Notch3 on the Cell Proliferation and Apoptosis Induced by CHIR99021 in NSCLC Cell Lines: Aunctional Link between Wnt and Notch Signaling Pathways. *PLoS One* (12):e84659.

42. Konishi J, Kawaguchi KS, Vo H, Haruki N, Gonzalez A, Carbone DP, Dang TP. Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces Proliferation in human lung cancers. *Cancer Res* 2007; 67: 8051-8057.

43. Veeraraghavalu K, Pett M, Kumar RV, Nair P, Rangarajan A, Stanley MA, et al. (2004) Papillomavirus-mediated neoplastic progression is

associated with reciprocal changes in JAGGED1 and manic fringe expression linked to notch activation. *J Virol*; 78: 8687-8700.

44. Xu K, Usary J, Kousis PC, Prat A, Wang DY, Adams JR, et al. (2012) Lunatic fringe deficiency cooperates with the Met/Caveolin gene amplicon to induce basal-like breast cancer. *Cancer Cell*; 21: 626-641.

45. Landi MT, Dracheva T, Rotunno M, Figueroa JD, Liu H, Dasgupta A, et al. (2008) Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. *PLoS One*; 3: e1651.

46. Stearman RS, Dwyer-Nield L, Zerbe L, Blaine SA, Chan Z, Bunn PA Jr, et al. (2005) Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model. *Am J Pathol*; 167: 1763-1775.

47. Fuming Yi, Baru Amarasinghe, Dang TP. (2013) Manic Fringe inhibits tumor growth by suppressing Notch3 degradation in lung cancer. *American Journal Cancer Reserch*; 3(5):490-9.

48. Wang XD, Leow CC, Zha J, Tang Z, Modrusan Z, Radtke F, et al. (2006). Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* 290, 66–80.

49. Wu X, Xu K, Zhang L, Zhang L, Deng Y, Lee P, Shapiro E, et al. (2011). Differentiation of the ductal epithelium and smooth muscle in the prostate gland are regulated by the Notch/PTEN-dependent mechanism. *Dev Biol* 356, 337–349.

50. Wang XD, Shou J, Wong P, French DM, Gao WQ, et al. (2004). Notch1-expressing cells are indispensable for prostatic branching morphogenesis during development and re-growth following castration and androgen replacement. *J Biol Chem* 279, 24733–24744.

51. Shou J, Ross S, Koeppen H, De Sauvage FJ, Gao WQ. (2001). Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res* 61, 7291–7297.
52. Valdez JM, Zhang L, Su Q, Dakhova O, Zhang Y, Shahi P, et al. (2012). Notch and TGF β form a reciprocal positive regulatory loop that suppresses murine prostate basal stem/ progenitor cell activity. *Cell Stem Cell* 11, 676–688.
53. Ousset M, Van Keymeulen A, Bouvencourt G, Sharma N, Achouri Y, Simons BD, et al. (2012). Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *Nat Cell Biol* 14, 1131–1138.
54. Wang ZA, Mitrofanova A, Bergren SK, Abate-Shen C, Cardiff RD, Califano A, et al. (2013). Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. *Nat Cell Biol* 15, 274–283.
55. Shubing Zhang, When-chen Chung, Wu G², Egan SE³, Xu K. (2014). Tumor-Suppressive Activity of Lunatic Fringe in Prostate Through Differential Modulation of Notch Receptor Activation. *Neoplasia* 16: 2, 158-167.
56. Prat, A., C.M. Perou. (2009). Mammary development meets cancer genomics. *Nat. Med.* 15:842–844.
57. Molyneux, G., F.C. Geyer, Magnay FA, McCarthy A, Kendrick H, Natrajan R, et al. (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 7:403–417.
58. Shehata, M., Teschendorff A, Sharp G, Novcic N, Russell IA, Avril S, et al. (2012). Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 14:R134.

59. Sleeman, K.E., H. Kendrick, Robertson D, Isacke CM, Ashworth A, Smalley MJ, et al. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J. Cell Biol.* 176:19–26.
60. Šale, S., D. Lafkas, Artavanis-Tsakonas S. 2013. Notch2 genetic fate mapping reveals two previously unrecognized mammary epithelial lineages. *Nat. Cell Biol.* 15:451–460.
61. Regan, J.L., H. Kendrick, F.A. Magnay, V. Vafaizadeh, B. Groner, M.J Smalley. 2012. c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer. *Oncogene.* 31:869–883.
62. Van Keymeulen, A., A.S. Rocha, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J et al. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479:189–193.
63. Kitamoto, T., K. Hanaoka. (2010). Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration. *Stem Cells.* 28:2205–2216.
64. Kuang, S., K. Kuroda, F. Le Grand, and M.A. Rudnicki. (2007). Asymmetric selfrenewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 129:999–1010.
65. Kent, S., J. Hutchinson, Balboni A, Decastro A, Cherukuri P, Drenzo J. (2011). Δ Np63 promotes cellular quiescence via induction and activation of Notch3. *Cell Cycle.* 10:3111–3118.
66. Mourikis, P., R. Sambasivan, et al. (2012). A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells.* 30:243–252.

67. Alunni, A., M. Krecsmarik, Bosco A, Galant S, Pan L, Moens CB, et al. (2013). Notch3 signaling gates cell cycle entry and limits neural stem cell amplification in the adult pallium. *Development*. 140:3335–3347.
68. Lafskas D, Rodilla V, Huyghe M, Mourao L, Kiaris H, Fre S. (2013). Notch3 marks clonogenic mammary luminal progenitor cells in vivo. *J Cell Biol* 203(1):47-56.
69. Xu K, Usary J, Kousis PC, Prat A, Wang DY, Adams JR et al. (2012). Lunatic fringe deficiency cooperates with the Met/ Caveolin gene amplicon to induce basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 21, 26–641.