

Università degli Studi di Milano

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Istituto di Neurologia

Scuola di Dottorato in Scienze Neurologiche e del Dolore

Ciclo XXIII

MED 26

**MECCANISMI PATOGENETICI
NELL'EMICRANIA EMIPLEGICA FAMILIARE E
SPORADICA: DESCRIZIONE DI TRE NUOVE
MUTAZIONI DEL GENE ATP1A2**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Claudio Mariani

Tutor: Dott. Andrea Gallanti

Tesi di Dottorato di

Veronica Cardin

Matricola R07579

Anno Accademico 2009/2010

Allegra, questo lavoro è dedicato a te, perché tu sei un Dono dal Cielo, perché nei tuoi occhi leggo ogni istante il mio Amore per il tuo papà e perché un giorno, magari sfogliandolo, capirai quanto essere un medico sia stato per la tua mamma molto più di un lavoro.

Brugherio, novembre 2010

Indice

Capitolo 1 L'emicrania emiplegica familiare e sporadica	pagina 4
*introduzione	pagina 4
*emicrania emiplegica familiare (FHM)	pagina 4
*emicrania emiplegica sporadica (SHM)	pagina 8
Capitolo 2 La genetica dell'emicrania emiplegica	pagina 11
*il gene CACNA1A e la FHM1	pagina 12
*il gene ATP1A2 e la FHM2	pagina 16
*il gene SCN1A e la FHM3	pagina 19
Capitolo 3 Materiali e Metodi	pagina 22
*campione	pagina 22
*indagini di laboratorio	pagina 27
Capitolo 4 Risultati	pagina 30
*premessa	pagina 30
*caso 1	pagina 31
*caso 2	pagina 32
*caso 3	pagina 35
Capitolo 5 Discussione	pagina 37
Bibliografia	pagina 46

Capitolo 1-L'EMICRANIA EMIPLEGICA FAMILIARE E SPORADICA

INTRODUZIONE

Nel 1910, con Clarke, iniziò la descrizione di famiglie di individui affetti da emicrania emiplegica familiare (Familial Hemiplegic Migraine, FHM), una particolare forma di emicrania, peraltro da alcuni ipotizzata come un'entità a sé, la cui esatta prevalenza è tuttora sconosciuta.

Ad oggi, le famiglie descritte sono oltre 150 ed un'indagine sistematica nazionale, eseguita sull'intera popolazione danese dal gruppo di Thomsen (2002), ha permesso di stimare una prevalenza di tale patologia, nell'anno 1999, pari allo 0,0005%.

Le descrizioni delle famiglie hanno messo in risalto due varianti cliniche di malattia: quella **pura**, nella quale l'esame neurologico effettuato nel periodo intercritico è pressoché nella norma, e quella **con segni cerebellari permanenti**, in cui nistagmo e/o atassia sono documentabili anche nelle fasi libere da attacco. La percentuale di famiglie affette da quest'ultima forma è pari al 20% circa anche se si ipotizza una sovrastima a causa dei bias che caratterizzano numerosi studi.

L'EMICRANIA EMIPLEGICA FAMILIARE (FHM)

Secondo la classificazione dell'International Headache Society (IHS), si formula diagnosi di emicrania emiplegica quando:

- A. Si verificano almeno 2 attacchi che soddisfino i criteri B:

B. L'aura consiste di ipostenia completamente reversibile che si accompagna ad almeno 1 dei seguenti sintomi/segni clinici:

1. disturbi visivi (positivi e/o negativi) completamente reversibili;
2. disturbi sensitivi (positivi e/o negativi) completamente reversibili;
3. disturbi a carico del linguaggio completamente reversibili.

C si verificano almeno 2 dei seguenti:

1. almeno uno dei sintomi caratterizzanti l'aura si sviluppa gradualmente nell'arco di tempo di almeno 5 minuti e/o differenti sintomi caratterizzanti l'aura di presentano in successione per almeno 5 minuti;
2. ciascun sintomo dell'aura dura almeno 5 minuti ma meno di 24 ore;
3. un dolore di tipo emicranico, rispondente ai criteri dell'emicrania senza aura, inizia con l'aura o la segue in un arco di tempo massimo di 60 minuti;

D almeno un parente di primo o di secondo grado presenta attacchi che soddisfino i criteri A→E;

E tali attacchi non sono riconducibili ad altra patologia e/o condizione.

Qualora il criterio D non venga soddisfatto, si parla di emicrania emiplegica sporadica (SHM).

L'età di esordio è più frequentemente intorno ai 10-15 anni e la frequenza degli attacchi tende, curiosamente, a ridursi con il progredire dell'età.

In circa 2/3 dei casi studiati sono stati riconosciuti fattori scatenanti comuni alle altre forme emicraniche, quali lo stress, ed i traumi cranici minori (Ducros et al, 2001). E' stato peraltro riportato in letteratura un unico e severo attacco di emicrania emiplegica esordito a brevissima distanza di tempo dall'introduzione endovenosa di un mezzo di contrasto iodato utilizzato per l'esecuzione di un'angiografia cerebrale (Jurkat-Rott et al, 2004).

Nell'emicrania emiplegica, tanto nella forma familiare quanto nella sporadica, pertanto, la caratteristica clinica fondamentale è data dal deficit stenico che può essere assai modesto o talmente

grave da arrivare ad una plegia vera e propria che, inevitabilmente, pone in diagnosi differenziale lo stroke. In generale, tuttavia, il deficit stenico è moderato e può coinvolgere, assieme ai disturbi sensitivi, un emisoma, con andamento alternante, oppure sempre lo stesso lato come si verifica nel 40-59% dei pazienti. Quando la sintomatologia sensitivo-motoria interessa un solo lato, coinvolge prevalentemente l'arto superiore, potendo risparmiare l'arto inferiore e l'emivolto omolaterali.

Nel caso di una bilateralità dei sintomi motori e sensitivi (descritti nel 25-49% dei pazienti), questi possono esordire contemporaneamente in entrambi i lati oppure prima da un lato e quindi diffondere controlateralmente.

Nella fase di aura l'ipostenia è sempre associata ad almeno un altro sintomo, più frequentemente sensitivo (98% dei casi) quindi visivo (89%) oppure disfasico (79%) (Thomsen et al, 2002). Quando presenti i disturbi del linguaggio consistono in diverse combinazioni di disartria, ridotta fluenza verbale e, meno frequentemente, parafasia; raramente si verifica un disturbo della comprensione (10%).

Complica il quadro clinico la possibile associazione di sintomi e/o segni di tipo basilare (alterazioni dell'equilibrio, diplopia, tinnito, ipoacusia, drop attack, perdita di coscienza) che rendono difficoltosa la diagnosi, soprattutto se si considera che la durata dell'aura in questa forma varia caratteristicamente da 10 minuti ad alcuni giorni, risolvendosi in genere nell'arco di 6 ore circa.

L'1% dei soggetti non riferisce dolore cefalico in corso di attacco mentre il 4% lo riferisce in maniera occasionale.

In aggiunta ai classici episodi sopra descritti, più del 40% dei pazienti sperimenta nel corso della propria vita uno o più attacchi cosiddetti atipici (Kors et al, 2001), consistenti in un'emigrania emiplegica con aura della durata di numerosi giorni. I casi più drammatici sono caratterizzati da una alterazione dello stato di coscienza di grado variabile (da una lieve sonnolenza al coma profondo con arresto respiratorio), associata o meno agli usuali sintomi dell'aura, ad iperpiressia (temperatura ascellare superiore ai 41°C), a crisi epilettiche parziali o generalizzate (Kors et al, 2001) nonché a

meningismo. Alcuni di questi pazienti necessitano di ventilazione assistita, anche per diversi giorni. Più del 50% di tali quadri drammatici si presenta entro il ventesimo anno di vita ed in circa il 20% dei casi rappresenta il primo episodio di interessamento neurologico FHM-correlato, spesso scatenato da traumi cranici minori (Ducros et al, 2001).

Indipendentemente dalla severità del singolo attacco e quindi dalla durata dei disturbi clinici, si ha generalmente la completa regressione del quadro, con un graduale periodo di ripristino che può tuttavia variare da giorni a settimane. Sono stati sinora descritti solo rari casi di persistenza di alcuni sintomi (confusione mentale, alterazioni visive ed uditive) quali esiti di attacchi (Spranger et al, 1999) ed ancor più raramente sono stati riportati in letteratura decessi (Kors et al, 2003).

Nei pazienti affetti da emicrania emiplegica possono coesistere anche altre forme emicraniche. Studi del 1981 avevano evidenziato che circa il 15% dei pazienti affetti da FHM presentava anche attacchi di emicrania con aura non emiplegica o di emicrania senza aura (34%) (Jensen et al). A conferma di ciò, di recente è stato dimostrato che i soggetti affetti ed i loro familiari di primo grado hanno da un lato un rischio maggiore di soffrire di emicrania con aura (non emiplegica) ma dall'altro hanno lo stesso rischio della popolazione generale di soffrire di emicrania senza aura (Thomsen et al, 2003).

Dal punto di vista terapeutico, tale forma non differisce dalle altre comuni forme emicraniche per cui il trattamento può essere di due tipi: sintomatico o preventivo. Va tuttavia precisato che nella maggior parte dei pazienti la frequenza degli attacchi è talmente bassa per cui generalmente si ricorre alla sola terapia sintomatica che è la stessa delle comuni forme emicraniche con aura.

In generale, gli attacchi tipici di emicrania emiplegica, tanto nei casi familiari quanto in quelli sporadici, dovrebbero essere trattati con analgesici orali, acido acetilsalicilico o farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS).

Kaube e collaboratori, nel 2000, hanno utilizzato la ketamina per via intranasale, al fine di ridurre la gravità e la durata del deficit stenico durante l'attacco, e ciò con successo.

Nel 1983 Centonze aveva somministrato a 2 pazienti, durante l'attacco, 0.4 mg di naloxone endovena ottenendo la rapidissima (< 2 minuti) e completa risoluzione del quadro neurologico ma non algico. Una rapida e completa risoluzione del quadro clinico si è inoltre ottenuta a seguito della somministrazione, in un paziente, di verapamil per via parentale (Yu et al, 2000).

Per quanto riguarda il ruolo dell'ergotamina e della diidroergotamina, ad oggi resta controverso (Tfelt-Hansen, 1991).

Altrettanto controverso è l'impiego dei triptani, soprattutto a seguito della somministrazione di sumatriptan s.c. in un paziente di 16 anni affetto da una forma familiare e che, a distanza di 4 giorni da tale trattamento farmacologico, al di là di una completa assenza di risposta, sviluppò alla RMN cerebrale una lesione infartuale nel territorio della cerebri media di destra e, di lì a poco, morì (Kors et al, 2001).

Per quanto riguarda infine la terapia preventiva, diversi case report indicano che l'acetazolamide potrebbe risultare efficace nelle forme di emicrania emiplegica familiare con atassia progressiva, se somministrata alle dosi di 250 mg x 2/die (Athwal et al, 1996; Battistini et al, 1999).

EMICRANIA EMIPLEGICA SPORADICA (SHM)

Alcuni pazienti, classificati secondo i criteri IHS in passato come affetti da emicrania con aura tipica o con aura prolungata, risultano in realtà affetti da emicrania emiplegica sporadica che da qualche tempo ha acquisito una propria dignità nosografica.

Nel mondo, sono stati descritti ad oggi più di 200 casi ed uno studio danese condotto dal Gruppo di Thomsen (2002) parla di una prevalenza della forma sporadica pressoché identica a quella familiare, sempre con una netta prevalenza del sesso femminile rispetto a quello maschile.

Probabilmente, da un punto di vista strettamente patogenetico, tali forme sporadiche possono essere suddivise in due gruppi:

- 1) forme conseguenti a mutazioni ex novo a livello dei geni coinvolti nelle forme familiari;
- 2) forme conseguenti ad una multifattorialità in cui ambiente, genetica e probabilmente altro a noi non ancora noto, interagiscono fra loro.

Secondo i criteri IHS, si può parlare di emicrania emiplegica sporadica (SHM) quando:

A si verificano almeno 2 attacchi che soddisfano i criteri B e C

B l'aura è caratterizzata da disturbi motori completamente reversibili e da almeno uno dei seguenti:

1. sintomi visivi completamente reversibili, di tipo positivo e/o negativo;
2. sintomi sensitivi completamente reversibili, di tipo positivo e/o negativo;
3. disturbi del linguaggio completamente reversibili;

C si verificano almeno 2 dei seguenti:

4. almeno uno dei sintomi caratterizzanti l'aura si sviluppa gradualmente nell'arco di tempo di almeno 5 minuti e/o differenti sintomi caratterizzanti l'aura di presentano in successione per almeno 5 minuti;
5. ciascun sintomo dell'aura dura almeno 5 minuti ma meno di 24 ore;
6. un dolore di tipo emicranico, rispondente ai criteri dell'emicrania senza aura, inizia con l'aura o la segue in un arco di tempo massimo di 60 minuti;

D nessun parente di primo o di secondo grado presenta attacchi che soddisfino i criteri A→E;

E tali attacchi non sono riconducibili ad altra patologia e/o condizione.

Dal punto di vista strettamente clinico, Thomsen e collaboratori hanno cercato di mettere a confronto pazienti affetti da SHM con pazienti affetti da FHM e ciò che se ne è dedotto è che siano pressoché identiche le caratteristiche e la durata dell'aura, la progressione dei sintomi e la frequenza degli attacchi. Peraltro, entrambe le forme sono sempre caratterizzate dalla comparsa di dolore

emicranico e sempre per entrambe la maggior parte dei pazienti (il 70% circa) presenta caratteristiche durante gli attacchi che potrebbero soddisfare anche i criteri IHS per l'emicrania basilare. Infine, anche nella forma sporadica possono verificarsi casi di notevole gravità ed in cui l'attacco esita in uno stato confusionale o comatoso oppure in deficit neurologici permanenti.

Capitolo 2-LA GENETICA DELL'EMICRANIA EMIPLEGICA

L'emicrania emiplegica familiare è l'unico tipo di emicrania per il quale sia stato descritto un meccanismo di ereditarietà monogenico, di tipo autosomico dominante. Come le altre malattie con questo tipo di trasmissione, la FHM colpisce in egual misura entrambi i sessi ed è trasmessa, sia per via paterna che per via materna, al 50% della discendenza.

La penetranza è incompleta per cui non tutti i portatori di gene mutato sviluppano la malattia e ciò complica in realtà il quadro, sia dal punto di vista del clinico che del genetista. Innanzitutto, infatti, può accadere che una persona asintomatica abbia figli affetti, rendendo più difficoltoso decidere se si tratti di FHM piuttosto che di SHM sulla sola base dell'anamnesi familiare. In secondo luogo, la penetranza incompleta suggerisce che nello sviluppo della malattia giochino un ruolo importante anche altri fattori quali quelli ambientali.

Per quanto riguarda i geni implicati, il primo ritenuto responsabile di emicrania emiplegica è il **CACNA1A**, mappato sul cromosoma 19p13 (Joutel et al, 1993) e coinvolto nel 50% circa di famiglie non selezionate e nella quasi totalità di famiglie con riscontro all'obiettività neurologica di segni cerebellari permanenti (Ophoff et al, 1994). Mutazioni a carico del gene CACNA1A sono responsabili delle forme emiplegiche familiari di tipo 1 (FHM1).

Nel 20% circa di famiglie affette da emicrania emiplegica sono state identificate mutazioni a carico del gene ATP1A2, mappato sul cromosoma 1q21-q23 e responsabile della forma di tipo 2 (FHM2).

Infine, il gene SCNA1A, che mappa sul cromosoma 2q24, risulterebbe coinvolto nella maggior parte dei restanti casi (Dichgans et al, 2005) ed è responsabile della forma di tipo 3 (FHM3).

IL GENE CACNA1A E LA FHMI

Il calcio (Ca^{++}) è una molecola di trasmissione essenziale in numerosissimi sistemi biologici. La sua concentrazione intracellulare è di circa 20.000 volte inferiore a quella extracellulare e ne consegue che incrementi importanti della sua concentrazione a livello intracellulare conducano a morte della cellula stessa e che tutti i meccanismi che regolano i flussi di Ca^{++} , sia in entrata che in uscita, siano di vitale importanza.

I principali regolatori delle sue concentrazioni intracellulari sono i canali del Ca^{++} voltaggio-dipendenti (Cooper et al, 1999) le cui caratteristiche sono primariamente correlate alle diverse alfa1 isoforme che li costituiscono. Queste consistono di 4 regioni omologhe (I-IV), ciascuna formata da 6 segmenti transmembrana ad alfa elica (S1-S6) e da un segmento P (pore forming), tra S5-S6, che attraversa soltanto il versante esterna della membrana fosfolipidica. Il segmento S4 contiene un aminoacido carico positivamente ciclicamente intercalato. Ogni 3 o 4 aminoacidi, e rappresenta il sensore di voltaggio del canale. Modificazioni dei potenziali a cavallo della membrana modificano l'interazione tra questi aminoacidi positivi e ciò con conseguenti modificazioni strutturali del canale che esitano infine nell'apertura e nell'ingresso di ioni.

Il gene CACNA1A codifica per la subunità alfa1A dei canali neuronali voltaggio-dipendenti di tipo P/Q (Ophoff et al, 1996), noti anche come canali Cav2.1 ed espressi unicamente a livello dei neuroni, sia centrali che periferici, in particolare a livello della corteccia cerebrale, dei gangli trigeminali e dei nuclei coinvolti nel controllo centrale del dolore (Pietrobon et al, 2003). Essi giocano un ruolo di rilievo nel controllo del rilascio di neurotrasmettitori tra cui il glutammato che, come vedremo in seguito, assieme al Ca^{++} ed al K^{+} riveste notevole importanza nel fenomeno della Cortical Spreading Depression (CSD). La localizzazione somatodendritica di questi canali ne suggerisce un ruolo anche a livello post-sinaptico, particolarmente per quanto riguarda la regolazione dell'eccitabilità neuronale.

Nel topo, la delezione del gene CACNA1A causa la comparsa di severa atassia cerebellare e di distonia nonché una degenerazione selettiva e progressiva a carico del cervelletto (Fletcher et al, 2001).

Mutazioni spontanee del canale Cav2.1, sempre nel topo, determinano quadri neurologici caratterizzati da atassia ed una riduzione delle correnti di tipo P/Q a livello delle cellule di Purkinje (Pietrobon, 2002). Infine, nei medesimi modelli sperimentali, ad una riduzione del 50% dei canali Cav2.1 corrisponde una riduzione della risposta al dolore, sia di tipo infiammatorio che neuropatico, dimostrando il ruolo dei canali stessi nel processo di sensitizzazione centrale (Luvisetto et al, 2006) e la contemporanea impossibilità a vicariarne o compensarne la funzione da parte di molteplici sinapsi centrali.

Nell'uomo, mutazioni del gene CACNA1A causano, oltre all'emicrania emiplegica familiare di tipo 1, anche l'atassia episodica di tipo 2 (EA2) e l'atassia spinocerebellare di tipo 6 (SCA6), fatto questo che non stupisce alla luce di quanto sopra esposto circa quanto dimostrato nel topo.

Dal punto di vista patogenetico, mentre è noto che l'atassia episodica di tipo 2 sia conseguenza di una loss of function a livello del gene che per questo motivo codifica per canali non più in grado di generare correnti di Ca⁺⁺ (Denier et al, 1999), per quanto riguarda la SCA6, è tuttora difficoltoso trarre conclusioni (Kordasiewicz et al, 2007).

Recentemente (Romaniello et al, 2010) è stata descritta una nuova mutazione missense a carico del gene CACNA1A, caratterizzata dalla sostituzione di una singola base, in eterozigosi, a livello dell'esone 9 (c1213G→A) e che causa nella famiglia affetta differenti fenotipi che vanno dalla SCA6 (probando) all'atassia episodica di tipo 2 (madre del probando) all'emicrania emiplegica familiare di tipo 1 (madre e zio del probando). Tale mutazione è per questa sua peculiarità particolarmente interessante e si ipotizza che vada ad inficiare l'interazione tra i loops intracellulari e la subunità beta portando ad una morte cellulare relativamente rapida, sicuramente influenzata

anche da fattori genetici ed ambientali che determinerebbero quadri clinici differenti. Peraltro, dato questo estremamente interessante, i vari studi di RMN hanno documentato in tutti gli individui portatori di mutazione, eccetto uno, segni di atrofia cerebrale e cerebellare e gli studi neurofisiologici (EEG, Potenziali Evocati) hanno confermato una sofferenza della corteccia cerebrale e della sostanza bianca.

Un'altra mutazione genetica recentemente studiata e causa di un grave fenotipo clinico è la mutazione S218L (Kaja et al, 2010). Quest'ultima è responsabile della comparsa negli individui affetti di emicrania emiplegica, atassia, crisi epilettiche ed edema cerebrale con coma fatale dopo traumi cranici di minima entità. Studi effettuati mediante topi mutanti knock-in hanno confermato i suddetti quadri clinici associati ad una riduzione della durata di vita ed hanno dimostrato un incremento del flusso di Ca^{++} all'interno dei terminali dei nervi motori e delle sinapsi centrali, verosimilmente quali causa di un fenotipo così grave.

Studi su sistemi sperimentali ad espressione eterologa hanno dimostrato che le mutazioni causa di FHM1 alterano nell'uomo diverse proprietà biofisiche dei canali Cav2.1, mediante meccanismi estremamente complessi ed in alcuni casi con effetti differenti a seconda della specifica mutazione presa in esame. In generale, tutte le forme di FHM1 analizzate presentano un **incremento del flusso in entrata di calcio** attraverso il singolo canale, in risposta ad una lieve depolarizzazione, evidente conseguenza di un aumento delle probabilità di apertura essenzialmente dovuto ad un abbassamento dei voltaggi necessari per l'attivazione del canale stesso (Tottene et al, 2005).

Altri studi sul topo portatore di mutazioni del gene CACNA1A hanno portato alle seguenti osservazioni:

- 1) la densità di corrente attraverso i canali Cav2.1 nelle cellule cerebellari dei granuli e dei neuroni corticali piramidali di topi con genotipo R192Q/S218L risulterebbe maggiore

rispetto a quella registrata in neuroni wild-type in caso di depolarizzazioni moderate (Curtain et al, 2006; Pizzorusso et al, 2006);

- 2) in tutti gli studi funzionali effettuati le mutazioni del gene in questione comportano un **gain of function** dei canali Cav2.1 che si traduce infine in una loro apertura a voltaggi inferiori ed a velocità più elevate rispetto ai wild-type, con conseguente ingresso di Ca⁺⁺ anche in risposta a depolarizzazioni minime.

Considerando il fenomeno di Cortical Spreading Depression,(CSD) ormai da tempo ritenuto alla base della patogenesi di forme emicraniche con e senza aura (Sanchez Del Rio, 2008), e volendo ipotizzare il meccanismo attraverso cui mutazioni del gene CACNA1A possano indurre tale patologia, diventa determinante ricondursi a quanto sinora esposto circa i canali Cav2.1. Infatti, la CSD, che si propaga attraverso la corteccia cerebrale con velocità nota, è caratterizzata da un'alterazione transitoria dei meccanismi che mantengono l'omeostasi corticale stessa accompagnandosi al viraggio verso l'acidità del compartimento extracellulare locale e ad una redistribuzione di Na⁺ e Cl⁻ nei comparti intracellulari.

Nel caso di FHM di tipo 1, l'aumentata suscettibilità alla CSD può essere spiegata considerando che l'abbassamento della soglia per l'apertura dei canali Cav2.1 mutati determina una riduzione del numero di ioni K extracellulari necessari per il rilascio di quantità di glutammato sufficienti ad iniziare il circolo a feedback positivo alla base della CSD. Inoltre, studi dimostrano che i canali Cav2.1 giocano un ruolo importante nella sensitizzazione del midollo spinale (Vanegas et al, 2000) e nelle vie discendenti, sia facilitatorie che inibitorie, che modulano il dolore trigeminale e spinale (Urban et al, 2005).

A supporto di questi studi, ve ne è uno recente (Agosto 2010) del gruppo di Nair che ha analizzato le conseguenze della mutazione missense R192Q del gene CACNA1A a livello dei recettori trigeminali neuronali P2X3. Più in dettaglio, si è visto che topi portatori della mutazione danno

origine ad un potenziamento della risposta recettoriale ganglionare, nel circuito coinvolgente la calcineurina, che esita infine in un potenziamento della nocicezione trigeminale.

IL GENE ATP1A2 E LA FHM2

Il gene ATP1A2 è stato identificato solo alcuni anni fa (De Fusco et al, 2003) ed è stato descritto per la prima volta in due famiglie italiane. Tale gene codifica per la subunità alfa2 della pompa Na⁺/K⁺, pompa ionica che sfrutta l'energia derivante dall'idrolisi di molecole di ATP per espellere dalla cellula ioni Na ed immetterne, contemporaneamente, ioni K. Il gradiente ionico che se ne ottiene garantisce il potenziale di membrana a riposo, mantiene costante il volume della cellula e le fornisce l'energia necessaria per il trasporto di nutrienti e di neurotrasmettitori.

Inoltre, la pompa sodio/potassio della glia e dei neuroni gioca un ruolo importante nella rimozione del K⁺ dallo spazio extracellulare durante l'attività neuronale (D'Ambrosio et al, 2002) ed è fondamentale anche per la rimozione del glutammato dallo spazio sinaptico dato che il trasporto attivo di quest'ultimo dipende, sia nei neuroni sia negli astrociti, dai gradienti di concentrazione degli ioni sodio e potassio.

La pompa è costituita dalle subunità alfa e beta: la prima contiene i siti di legame per l'ATP ed i cationi e presenta un voluminoso anello che può subire notevoli modificazioni conformazionali durante il funzionamento dell'enzima; la seconda svolge una funzione di tipo regolatorio.

Sinora nell'uomo sono state descritte più di 23 mutazioni a carico del gene ATP1A2 di tipo missense e tutte comportanti la sostituzione di aminoacidi altamente conservati nei soggetti sani e siti in regioni importanti per il funzionamento della pompa. Più precisamente, le mutazioni si localizzano in genere a livello dell'anello intracellulare, tra i segmenti trans-membrana 4 e 5, e a livello dell'anello extracellulare, tra i segmenti 7 e 8 (Jorgensen et al, 2003).

Accanto alle mutazioni missense, sono state descritte mutazioni frame, che comportano una delezione, e mutazioni frameshift, in cui si ha uno slittamento a valle delle sequenze e la successiva formazione di un codone di stop che determina l'arresto prematuro della trascrizione del gene ATP1A2 (Riant et al, 2005).

In generale, comunque, qualunque sia il tipo di mutazione considerata, si assiste infine ad una loss of function della pompa Na⁺/K⁺ ATPasi. Addirittura, nel caso di 3 mutazioni studiate (L764P, W887R, G615R) si è documentata una marcata o completa perdita dell'attività stessa dal momento che le cellule HeLa transfette andavano incontro ad una rapida morte nel caso di somministrazione di oubaina (De Fusco et al, 2003; Vanmolkot et al, 2006). Nel caso specifico delle mutazioni L764P e W887R è stata accertata l'**assenza totale** di correnti ioniche, e quindi di attività della pompa, negli oociti di *Xenopus*, una rana spesso impiegata nell'ambito della ricerca scientifica (Koenderink et al, 2005).

La loss of function di cui sopra può esprimersi sotto forma di una minore affinità per il K⁺ (Segall et al, 2004), una minore attività catalitica e/o un'elevata affinità per gli ioni potassio extracellulari (Segall et al, 2005).

Nel cervello del topo, la subunità alfa2 della Na⁺/K⁺ ATPasi durante lo sviluppo embrionale e alla nascita è espressa principalmente nei neuroni (Moseley et al, 2003). Durante il periodo embrionale, in animali con genotipo ATP1A2^{-/-} sono stati dimostrati una compromissione della rimozione dei neurotrasmettitori ed un incremento dell'attivazione neuronale a livello dell'amigdala e della corteccia piriforme (Ikeda et al, 2003). Questi animali muoiono alla nascita a causa della mancanza di attività respiratoria spontanea, per compromissione dei relativi nuclei, verosimilmente dovuta alle elevate concentrazioni intracellulari di Cl⁻ che determinerebbero, in corso di attivazione GABA-mediata, una depolarizzazione paradossa anziché l'iperpolarizzazione che normalmente si registra. Tali dati suggeriscono l'esistenza di un accoppiamento specifico tra la alfa2 Na⁺/K⁺ ATPasi ed il

cotrasportatore K^+/Cl^- neurone-specifico che espelle ioni cloro dal citoplasma delle cellule dei centri respiratori (Ikeda et al, 2004).

E' stata inoltre documentata un'associazione anche tra la α_2 della Na^+/K^+ ATPasi e quella dello scambiatore Na^+/Ca^{++} nelle colture di cellule astrocitarie, a suggerirne un ruolo specifico anche nella regolazione dei flussi di Ca^{++} a livello del reticolo endoplasmatico (Juhaszova et al, 1997).

Nella corteccia cerebrale del ratto adulto l'isoforma α_2 della Na^+/K^+ ATPasi è invece localizzata esclusivamente nelle cellule gliali e la sua distribuzione è identica a quella dei trasportatori del glutammato di tipo GLAST e GLUT1. A livello ultrastrutturale questa isoforma sembra localizzata soprattutto in sinapsi a trasmissione glutammatergica (Cholet et al, 2002). Alla luce di queste e di altre evidenze (Pellerin et al, 1997), si considera oggi come certo il ruolo dell'isoforma α_2 della Na^+/K^+ ATPasi nelle vie del glutammato della corteccia dell'adulto.

In sintesi, le mutazioni a carico del gene ATP1A2, e dunque a carico della pompa Na^+/K^+ ATPasi, possono essere così inquadrare nell'ambito del fenomeno della Cortical Spreading Depression: l'alterazione nel funzionamento della suddetta pompa porterebbe ad una diminuita rimozione di K^+ e di glutammato da parte degli astrociti nel corso dell'attività neuronale corticale che a sua volta indurrebbe una depolarizzazione **protratta** dei neuroni ed un aumento del glutammato nel vallo sinaptico, **compromettendo infine il recupero della funzionalità elettrica**. Di conseguenza, stimoli depolarizzanti relativamente blandi, privi di conseguenze nei soggetti sani, inducono nei pazienti FHM2 un picco di concentrazione di ioni K^+ che non si discosta di molto da quello necessario a generare un'onda di Cortical Spreading Depression.

IL GENE SCN1A E LA FHM3

Il gene responsabile dell'emigrania emiplegica familiare di tipo 3 (FHM3) è stato identificato piuttosto recentemente, nel 2005, nel corso di un'analisi su tre famiglie tedesche (Dichgans et al, 2005). Tale gene, denominato SCN1A, è localizzato sul cromosoma 2q24 e codifica per i canali del sodio voltaggio-dipendenti (Nav1.1), strutturalmente simili a quelli del calcio, voltaggio-dipendenti, e pertanto costituiti da una subunità alfa1 che presenta sei segmenti transmembrana ripetuti in quattro domini omologhi. La mutazione descritta nelle tre famiglie tedesche di cui sopra (Gln1489Lys) si localizza a livello del segmento citoplasmatico che congiunge i domini III e IV e sembra che determini un incremento della frequenza di scarica neuronale (Dichgans et al, 2005).

I canali Nav1.1 sono espressi principalmente nel Sistema Nervoso Centrale, a partire dalla seconda settimana di vita, e sono più numerosi nelle regioni caudali rispetto a quelle rostrali. I neuroni che li esprimono sono quelli ippocampali, i piramidali corticali e gli interneuroni inibitori; in questi ultimi essenzialmente a livello del soma e dei dendriti prossimali (Gong et al, 1999; Yu et al, 2006). Una specifica localizzazione somatodendritica implica un possibile ruolo dei suddetti canali nella modulazione dell'eccitabilità dendritica quindi nell'elaborazione sinaptica del segnale (Johnston et al, 1996).

Studi sperimentali dimostrano che una delezione a livello della subunità alfa1 dei canali Nav1.1 non ha effetti evidenti sulle correnti del Na⁺ a livello dei neuroni ippocampali dei topi *scn1a* ^{-/-} mentre comporta una riduzione del 50% del flusso ionico di Na⁺ negli interneuroni inibitori nei topi eterozigoti, suggerendo, pertanto, che tali canali possano essere **i principali, se non addirittura gli unici, responsabili delle correnti sodiche in queste cellule.**

Nei medesimi modelli sperimentali, e sia nella condizione di omozigosi che di eterozigoti, l'eccitabilità degli interneuroni GABAergici risulta ridotta, fatto questo che potrebbe giustificare la comparsa, negli animali affetti, di crisi epilettiche (Yu et al, 2006).

Studi piuttosto recenti, eseguiti nel corso di indagini a livello del gene SCN1A, hanno permesso di comprendere più a fondo un'altra patologia neurologica, anch'essa conseguente a sue mutazioni: la Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy (SMEI). Tale malattia è rara ed è caratterizzata dalla precoce insorgenza di convulsioni febbrili seguite da epilessia refrattaria a qualunque trattamento, da decadimento mentale e da atassia. Le mutazioni del gene CACNA1A sembrano qui causare alterazioni del canale Nav1.1 del tipo *truncating*, con conseguente e completa perdita della funzionalità del canale stesso. In realtà, talune mutazioni *missense*, sottoposte ai test di funzionalità in sistemi ad espressione eterologa, hanno prodotto dei canali umani non funzionanti ma per difetti misti ovvero sia per una *gain* che per una *loss of function*.

Un'altra patologia, conseguente a mutazioni del gene SCN1A, e dunque ad alterazioni a livello dei canali Nav1.1, è la Generalized Epilepsy with Febrile Seizures plus (GEFS+), anch'essa caratterizzata da un fenotipo epilettiforme, ma di gravità inferiore rispetto alla SMEI, con la quale tuttavia condivide il meccanismo patogenetico sottostante: una riduzione di eccitabilità a livello degli interneuroni inibitori.

La FHM3, parimenti alle altre due patologie di cui sopra, è una canalopatia in cui la mutazione genica causa alterazione delle correnti neuronali di sodio, del firing neuronale e del funzionamento del network neuronale, almeno per quanto è emerso sinora dai vari modelli sperimentali.

Se si considera che un singolo gene mutato può in questo caso causare almeno tre differenti patologie neurologiche, è intuitivo quanto sia cruciale comprendere gli esatti meccanismi patogenetici sottostanti. Si sottolinea che, peraltro, l'epilessia può essere considerata il fenotipo

maggiormente condiviso da tutte e tre le condizioni morbose (FHM3, SMEI, GEFS+), essendo stata descritta anche in 3 fra i 18 pazienti FHM3 studiati dal gruppo di Dichgans (2005).

Volendo interpretare le evidenze ad oggi note in chiave semplicistica, si potrebbe ipotizzare, nei pazienti portatori di mutazioni del gene SCN1A, un'incrementata suscettibilità alla Cortical Spreading Depression a seguito di stimoli blandi, innocui per la popolazione sana, responsabili negli individui affetti di un aumento eccessivo delle scariche sinaptiche neuronali con conseguente incremento delle concentrazioni extracellulari di K⁺ sino al raggiungimento della soglia per la genesi dell'onda di Cortical Spreading Depression.

Capitolo 3-MATERIALI E METODI

CAMPIONE

Considerate l'utilità ed il senso di un'analisi genetica in generale, si è posta particolare attenzione alla scelta del campione.

I pazienti, selezionati tra i numerosissimi afferenti al nostro Centro Cefalee, dovevano presentare le seguenti caratteristiche:

- 1) essere affetti da una forma familiare, o sporadica, di Eemicrania Emiplegica, rispondente ai criteri dell'International Headache Society (IHS);
- 2) essere in possesso degli esiti delle indagini clinico-strumentali effettuate al fine di escludere qualunque forma sintomatica;
- 3) essere favorevoli all'esecuzione di un test genetico e soprattutto consapevoli delle relative implicazioni;
- 4) essere precisi nel ricostruire il proprio albero genealogico, completo per almeno 3 generazioni;
- 5) avere un'anamnesi patologica (prossima e remota) e fisiologica negative per elementi che potessero in qualche modo porre dubbi circa la correttezza della formulazione diagnostica;
- 6) presentare un'obiettività neurologica, eseguita nel corso della valutazione ambulatoriale, negativa.

La caratteristiche del campione selezionato sono riassunte nella seguente tabella:

Tabella 1

Sesso	6 MASCHI	18 FEMMINE
Età	Dai 12 anni	Ai 54 anni
Diagnosi secondo IHS	13 FHM	11 SHM

Ciascuno dei 24 pazienti era giunto alla nostra osservazione, come già anticipato nel capitolo precedente, a seguito del primo attacco di emicrania emiplegica, preoccupato per il deficit stenico verificatosi durante l'attacco. Le modalità di valutazione del paziente, in acuto, sono state le seguenti:

- 1) tramite valutazione in Pronto Soccorso durante il turno di guardia;
- 2) tramite consulenza in Pronto Soccorso su invito del medico di guardia;
- 3) tramite valutazione in ambulatorio all'indomani di una dimissione dal Pronto Soccorso.
- 4)

Tali 24 pazienti sono stati selezionati nell'arco di tempo di quasi 4 anni, ovvero dal 2007 ad oggi e, pertanto, **il nostro lavoro non è altro che una sintesi di quanto sinora riscontrato, dal punto di vista genetico, in quei soggetti che sono entrati a far parte di una vera e propria biobanca, probabilmente la prima per quanto attiene l'emicrania emiplegica familiare e, ancor più probabilmente, quella sporadica.**

La tabella (tabella 2) ed il grafico (grafico 1) seguenti descrivono, sinteticamente, le caratteristiche cliniche principali dei pazienti che costituiscono il nostro campione, ad eccezione dei 2 pazienti risultati positivi alla ricerca di mutazioni genetiche. Infatti, di questi, si tratterà ampiamente nel capitolo “Risultati” ove alla descrizione clinica, dettagliata, seguirà la descrizione del tipo di mutazione genetica riscontrata. Il tutto, affinché sia più semplice, poi, tentare una correlazione genotipo-fenotipica.

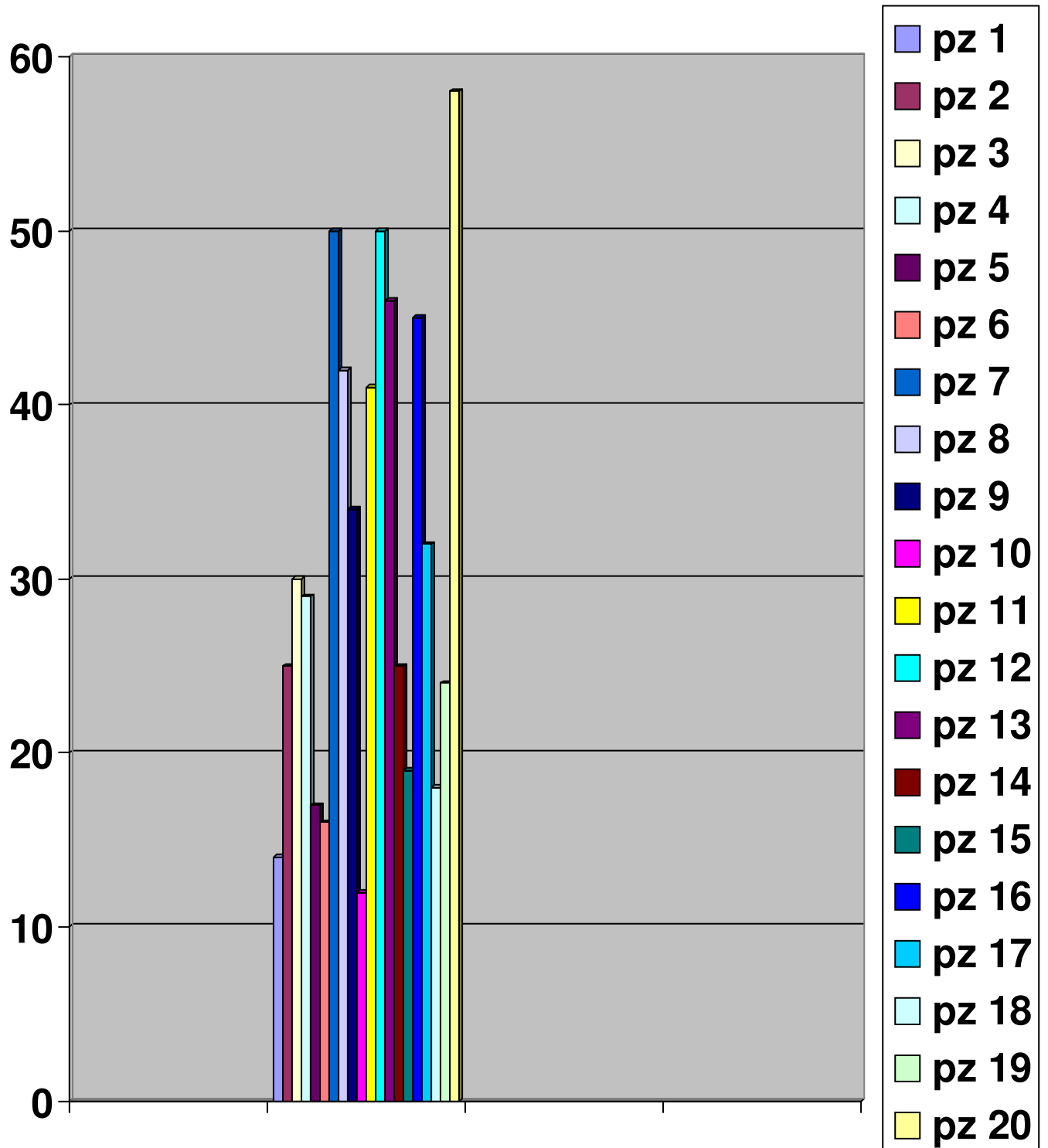
Tabella 2– caratteristiche cliniche dei pazienti costituenti il campione

Paziente	Durata fase emiplegica (ore)	Frequenza attacchi/anno	Risposta al farmaco	Terapia sintomatica
1*	*	*	*	*
2*	*	*	*	*
3*	*	*	*	*
4	1	1	Si	FANS
5	1	1	Si	FANS
6	2	<1	Si	FANS
7	4	<1	Si	FANS
8	3	<1	Si	FANS
9	3	<1	Si	FANS
10	2	<1	Si	FANS
11	2	<1	Si	FANS
12	2	<1	Si	FANS
13	1	2	Si	FANS
14	4	<1	Si	FANS
15	1	1	Si	FANS
16	6	1	Si	FANS
17	1	1	Si	FANS
18	1	2	Si	FANS
19	3	1	Si	FANS
20	3	<1	Si	FANS
21	1	<1	No	FANS
22	1	<1	Si	FANS
23	2	<1	Si	FANS
24	2	<1	Si	FANS

NB- I pazienti contraddistinti dal simbolo * sono quelli risultati positivi alla ricerca di mutazioni in uno dei tre geni associati all’emicrania emiplegica.

Grafico 1: l'età di esordio (asse delle ordinate, espressa IN ANNI), come dimostra la tabella 2, è

molto variabile



La prima e principale difficoltà di fronte alla quale ci si è trovati è stata quella di accertare che le caratteristiche cliniche dell'attacco riferito fossero effettivamente riconducibili a quelle di una emicrania emiplegica e non di un'emicrania con aura. Per tale motivo, sono stati selezionati pazienti visitati durante l'attacco da uno specialista neurologo presso un Pronto Soccorso nel quale si erano recati a seguito della comparsa del deficit stenico attuale e non per il dolore emicranico. Tale strategia, se da un lato ha probabilmente ridotto il numero di pazienti testati, dall'altro ci ha permesso di formulare la diagnosi con una considerevole certezza, il tutto al fine di evitare falsi negativi e/o falsi positivi.

Per quanto riguarda la **modalità di esordio**, per tutti e 24 i pazienti selezionati l'attacco descritto presentava le caratteristiche di un comune attacco di emicrania emiplegica, con il deficit stenico che, in circa la metà dei casi (10 pazienti), era preceduto da un disturbo di tipo visivo caratterizzato da scotomi scintillanti e/o da amputazioni del campo visivo.

Relativamente alla **durata** dell'attacco, alla **risposta** o meno alla terapia farmacologica ed al tipo di **trattamento sintomatico** utilizzato, i dati sono riportati nella tabella tabella 2.

INDAGINI DI LABORATORIO

Dopo aver ottenuto un consenso scritto da parte dei soggetti interessati (alcuni pazienti si sono rifiutati di sottoporsi all'indagine genetica), si è proceduto al prelievo di 5 ml di sangue raccolto in provette in EdTa, immediatamente inviate al Laboratorio oppure congelate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in attesa di un loro successivo invio. Il prelievo di sangue è stato **sistematicamente** effettuato sul paziente e su almeno altri 2 parenti sani, ove possibile appartenenti a due differenti generazioni.

Dai relativi leucociti è stato purificato il DNA mediante l'utilizzo di un **kit IsoQuick** per l'estrazione di acidi nucleici (ORCA, Research, WA, USA). 200 individui sani si sono resi disponibili come controlli.

Per l'amplificazione e quantificazione simultanee del DNA si è poi ricorsi alla **PCR** (reazione a catena della polimerasi) quantitativa, denominata per le sue caratteristiche anche PCR real-time. Il DNA estratto, pertanto, è stato prima amplificato, per diversi cicli, e, dopo ciascun ciclo, è stato quantificato mediante l'uso di colorazioni fluorescenti.

In una reazione tipica, il prodotto della PCR raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione per cui, al fine di renderlo rilevabile, sono in genere necessari numerosi cicli, il cui diagramma di fluorescenza presenta un andamento sigmoidale che tende alla fine ad appiattirsi a seguito della scarsità del substrato via via che si procede. Il punto sulla curva di questo diagramma corrispondente al momento in cui la quantità di fluorescenza inizia ad aumentare velocemente, viene chiamato **ciclo soglia** (Ct). L'analisi dei valori del ciclo soglia è quella che permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare e la pendenza della curva fornisce una misura dell'efficienza del metodo.

Per una buona riuscita della PCR è necessaria una scelta oculata dei **primer** che devono ibridarsi in maniera specifica ed efficiente solo alla sequenza di interesse, tralasciando le altre.

Le sequenze genomiche dei geni CACNA1A, ATP1A2 ed SCN1A sono disponibili nel portale del genoma umano (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) e tutti i numeri dei nucleotidi fanno riferimento alla pubblicata sequenza cDNA ATP1A2 NM_000702.

In generale, per la diagnosi di patologie genetiche si può ricorrere a due tipi differenti di primer: primer che siano complementari a regioni adiacenti a quella in cui si trova la mutazione da ricercare oppure primer in cui vi sia la complementarietà di uno dei due con la sequenza mutata e, in quest'ultimo caso, in assenza di mutazione non vi sarà logicamente alcun prodotto di amplificazione.

Nell'allestimento di una PCR, la distanza compresa tra i due primer è alquanto flessibile, potendo andare dalle 100 sino alle 10.000 paia di basi anche se per cifre superiori alle 3.000 basi l'efficienza dell'amplificazione tende a diminuire per cui, per ovviare a tale limite, sono state ideate varianti della DNA polimerasi prive dell'attività esonucleasica, dal 5' al 3'.

Per quanto riguarda invece la lunghezza del primer, questa è generalmente compresa tra le 20 e le 30 paia di basi e, per non pregiudicare la specificità del processo, non dovrebbe mai essere inferiore alle 16 paia.

Nello specifico caso in questione, i primer utilizzati per i geni ATP1A2 e CACNA1A sono già stati descritti in letteratura (Bassi et al, 2006) mentre quelli utilizzati per il gene SCN1A sono messi a disposizione dal gruppo della Dottoressa Bassi e coprono l'intera regione codificante nonché una parte delle sequenze introniche.

Le sequenze delle nuove mutazioni documentate sono state allestite mediante il kit Big Dye Terminator, nella versione 3.1, utilizzando il sistema applicativo ABI 3130XL e sono state analizzate mediante il programma Sequencing 3.7 NT (Applied Biosystem Foster City, CA, USA).

La nomenclatura delle mutazioni si basa sul sistema reperibile nel sito <http://www.hgvs.org/mutnomen>, e fa riferimento alla sequenza pubblicata cDNA.

Per tutti i pazienti affetti da Eemicrania Emiplegica Familiare, oltre a quello del probando, è stato prelevato un campione di sangue di almeno un altro parente affetto e di un parente sano, facendo così salire il numero di pazienti testato a **61**, per un totale di 45 femmine e 16 maschi.

Come precisato nel paragrafo precedente, i risultati delle indagini genetiche sono stati confrontati con quelli ottenuti da 200 controlli sani e dai quali non è emersa alcuna mutazione a carico dei tre geni implicati in questa patologia, il CACNA1A, l'ATP1A2 e l'SCN1A.

In questi pazienti con familiarità, si è partiti dall'analisi del gene CACNA1A, per testare poi, in caso di negatività, il gene ATP1A2 ed infine il gene SCN1A.

Per ciascun paziente affetto da una forma sporadica, si è partiti invece dall'analisi del gene ATP1A2, proprio perché più frequentemente mutato nei casi sporadici. Nel caso di una negatività di quest'ultimo, si è quindi proceduto ad un'analisi del gene CACNA1A, quindi del gene SCN1A.

Capitolo 4-RISULTATI

PREMESSA

Sono stati selezionati 24 pazienti, **tutti** affetti da emicrania emiplegica, familiare o sporadica, diagnosticata **sulla base dei criteri IHS**. Come già anticipato nel capitolo precedente, questo nostro lavoro vuole illustrare i risultati ottenuti, dal 2007 ad oggi, in un campione di pazienti il cui DNA, previo consenso informato, è venuto a far parte di una biobanca, al momento, come vedremo, utilizzata per la ricerca di mutazioni solo a carico dei 3 geni ad oggi correlati a questa forma emicranica: il CACNA1A, l'ATP1A2 e l'SCN1A.

Ciascun paziente selezionato è stato sottoposto alle seguenti indagini clinico-strumentali:

- 1) **esami ematochimici**, comprensivi di ricerca di autoanticorpi e di dosaggio degli indici infiammatori cronici;
- 2) **esame chimico-fisico urinario**;
- 3) **ECG**;
- 4) **Ecocardiogramma transtoracico e transesofageo** per la ricerca di aneurismi del setto e/o di pervietà del forame ovale;
- 5) **Eco color Doppler dei Tronchi Sovra Aortici**, con valutazione dell'arco aortico al fine di escludere placche anche a tale livello;
- 6) **Eco color Doppler Transcranico con bubble test** (e visualizzazione del profilo velocimetrico dei seguenti vasi arteriosi attraverso la finestra transtemporale bilateralmente: cerebrale media destra e sinistra, cerebrale anteriore destra e sinistra, cerebrale posteriore nel

tratto P1 (pre-comunicante) e P2 (post-comunicante) destra e sinistra; attraverso la finestra suboccipitale: vertebrale destra, vertebrale sinistra, giunzione vertebro-basilare);

- 7) **EEG** in condizioni basali;
- 8) **RMN cerebrale**, senza e con somministrazione di gadolinio;
- 9) **Angio-RMN dei vasi intracranici**.

Inoltre, in alcuni pazienti giunti in Pronto Soccorso e con quadri clinici fortemente suggestivi di una forma infettivo/infiammatoria, è stato eseguito un prelievo del liquor cefalorachidiano.

Tutte le indagini eseguite sono risultate, in tutti i pazienti selezionati, **negative**.

Negativo è risultato anche l'esame **obiettivo neurologico** eseguito nel periodo intercritico.

PAZIENTE NUMERO 1

Va innanzitutto precisato che, per il tipo di indagine eseguita, non si possono formalmente escludere delezioni emizigotiche interessanti singoli esoni, accanto a quelle individuate mediante prove di Q-PCR. Peraltro, non si possono neppure escludere eterozigosi in siti SNP (nei geni CACNA1A ed ATP1A2).

Il metodo utilizzato ha permesso di identificare, nel campione di pazienti selezionato (=24), **3 mutazioni a carico del gene ATP1A2, mai descritte prima in letteratura da altri gruppi (Tonelli*, Gallanti* et al, 2007 e 2008).**

La prima delle tre mutazioni (Tyr9Asn) è stata riscontrata in una paziente di sesso femminile, di anni 50 al momento del prelievo, giunta al nostro Pronto Soccorso a seguito di un attacco di emicrania emiplegica di durata superiore a quelli sino a quel momento riferiti, con la frequenza di circa 1 all'anno. Per tale motivo, vista la durata del disturbo ipostenico agli arti di sinistra, risoltosi completamente nell'arco di 5 giorni, è stata successivamente ricoverata presso l'Unità Operativa di

Neurologia. La paziente, con una familiarità assolutamente negativa, per almeno tre generazioni, per patologie analoghe, è stata sottoposta, in aggiunta a tutte le indagini clinico-strumentali descritte nel capitolo “materiali e metodi”, ad un prelievo di liquor cefalo-rachidiano, al fine di escludere qualunque evento vasculitico e/o infiammatorio.

Tale paziente, con una anamnesi patologia e remota, assolutamente negative per elementi di rilievo, è risultata positiva per la mutazione Tyr9Asn. Tale mutazione, a livello del gene ATP1A2, dunque a livello del cromosoma 1, si localizza nell'estremità N-terminale del gene stesso che, peraltro, costituisce una sede atipica di mutazione.

Più precisamente, a livello dell'esone 2 è stato documentato uno scambio di nucleotidi (c25T>A) che comporta infine la sostituzione di un residuo di tirosina con uno di asparagina (p.Tyr9Asn). Si tratta di una mutazione *missense* (Tonelli*, Gallanti* et al, 2007).

Al fine di escludere che questa mutazione fosse in realtà una variante genotipica, è stata comunque ricercata anche nella figlia della paziente, non affetta da emicrania emiplegica né da altre patologie di rilievo.

PAZIENTE NUMERO 2

La seconda mutazione descritta è stata riscontrata in una donna di anni 44, giunta al nostro Centro Cefalee a seguito di una storia di emicrania emiplegica, peraltro familiare, i cui attacchi erano di frequenza variabile (da 1 all'anno a 2 al mese). Il disturbo ipostenico, di grado lieve-moderato, associato a parestesie e ad impaccio nell'eloquio, era sempre preceduto da un'aura visiva e presentava una durata non inferiore alle 24 ma mai superiore alle 72 ore.

L'anamnesi patologica, prossima e remota, della paziente era assolutamente negativa per altre patologie di rilievo.

Come anticipato sopra, sia una sorella che un fratello della paziente risultavano affetti dalla medesima forma emicranica (le specifiche caratteristiche cliniche sono riassunte nella tabella 4); la

mamma ed alcune zie della paziente ne erano risultate affette ma nessuno dei figli, sia del probando che del fratello e della sorella, a tutt'oggi ne risulta affetto.

Va precisato che proprio la consistente familiarità del disturbo non ha mai indotto la Paziente a sottoporsi ad accertamenti clinico-strumentali, reputando, in fondo, la patologia come “qualcosa di normale” all'interno della propria famiglia.

La tabella seguente (tabella 4) riassume le caratteristiche cliniche del probando, del fratello e della sorella, al fine di un confronto fenotipico tra individui portatori della medesima mutazione.

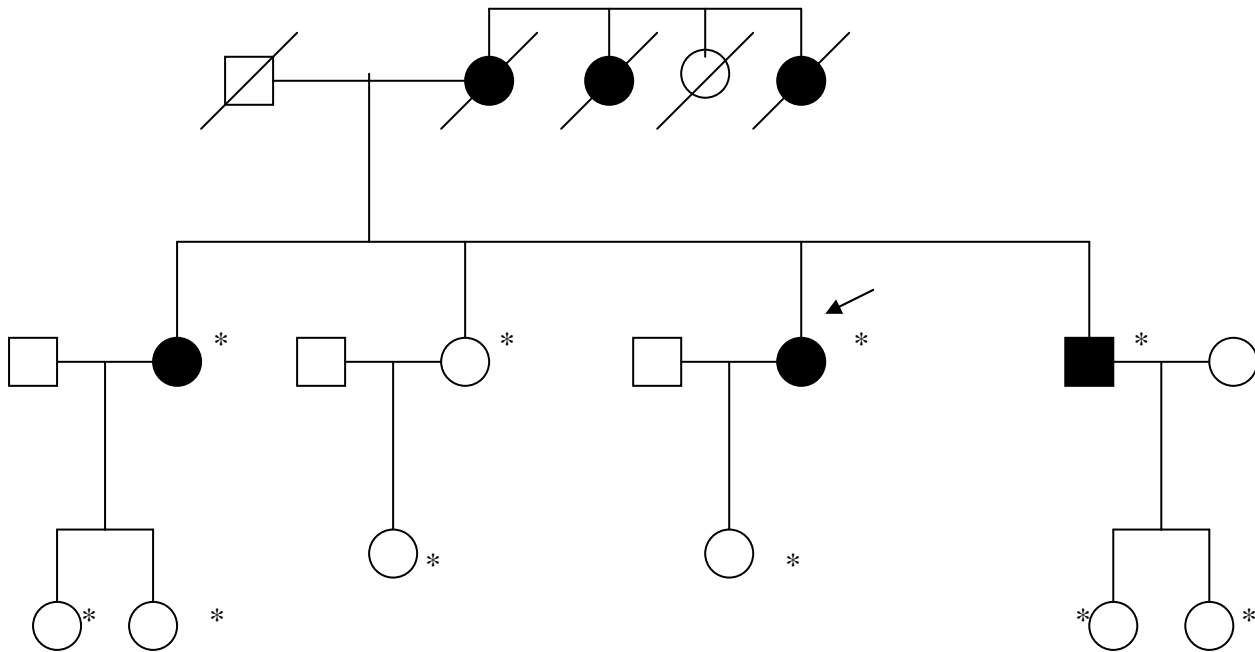
Tabella 4-caratteristiche cliniche del probando e dei familiari affetti da FHM





paziente	Emicrania emiplegica	Frequenza attacchi	Durata fase emiplegica	Risposta alla terapia sintomatica
Probando(II-3)	sì	1/anno→ 2/mese	24-72 ore	sì
Fratello(II-4)	sì	1-2/anno	48-72 ore	sì
Sorella (II-1)	sì	<1/anno	5 ore	sì

Di seguito (figura 1) viene riportato l'albero genealogico della paziente che dimostra, peraltro, quanto segue:

- 1) una dominanza della mutazione, presente in almeno due generazioni successive;
- 2) la matrilinearità della mutazione stessa;
- 3) la assoluta concordanza tra la presenza di mutazione genetica e la presenza di malattia.

Figura 1: albero genealogico del probando



-  Pazienti affetti
-  Pazienti deceduti
-  Pazienti sottoposti a test genetico
-  Probando

Un discorso a parte merita la terapia sintomatica assunta dagli individui appartenenti a questa famiglia. Infatti, risultando resistenti a qualunque trattamento farmacologico tentato nel passato, ergotaminici compresi, su consiglio del curante il probando ha iniziato ad assumere, un paio di anni prima di giungere alla nostra osservazione, una terapia sintomatica a base di almotriptano, risultata

da subito completamente e rapidamente efficace. La medesima risposta, peraltro, si è verificata negli altri familiari affetti da FHM.

Dal punto di vista genetico, nel probando è stata riscontrata una mutazione a carico del gene ATP1A2 sul cromosoma 1. Tale mutazione, a livello dell'esone 4, consiste in un cambio di nucleotidi (c.193C>T) che comporta infine la sostituzione di un'arginina, carica positivamente, con un residuo di triptofano, elettricamente neutro ed idrofobico (p.Arg65Trp). Anche in questo caso, trattasi di mutazione *missense* (Tonelli*, Gallanti* et al, 2007).

Al fine di comprenderne il significato, tale mutazione è stata ricercata, sempre previo consenso informato, anche negli altri familiari affetti (II-1 e II-4), nella sorella sana (II-2), nella figlia (III-4) e nei figli dei fratelli affetti (III-1, III-2, III-5, III-6).

Non è stato possibile effettuare un'indagine genetica in altri membri della famiglia perchè o deceduti oppure residenti in regioni di Italia, oppure perchè contrari a sottoporsi a tale esame.

PAZIENTE NUMERO 3

Una paziente di 11 anni, di sesso femminile, è giunta alla nostra osservazione a seguito di un accesso al Pronto Soccorso pediatrico per un primo attacco di aura visiva, caratterizzata da amputazione del campo visivo e da scotomi scintillanti, della durata di 20 minuti circa, seguita da un impaccio motorio agli arti di destra, più evidente all'arto superiore, associato a disturbo dell'eloquio di tipo espressivo. Tale quadro, seguito dalla comparsa di dolore pulsante e bitemporale, è regredito completamente nell'arco di 4 ore circa. La paziente, valutata anche nel periodo post-critico, ha qui presentato una obiettività neurologica assolutamente negativa.

L'anamnesi familiare (la bambina è figlia unica, il padre vive lontano e di lui come dei suoi parenti non si sa nulla) è risultata apparentemente negativa.

Tutte le indagini clinico-strumentali eseguite sono risultate nella norma.

Va tuttavia precisato, dato questo importante, che all'età di 6 anni la paziente aveva presentato una prima crisi epilettica, descritta dalla madre come tonico-clonica generalizzata (manca la documentazione rimasta in Perù, suo Paese di origine), trattata per diversi anni con acido valproico, poi sospeso per l'assenza di ulteriori crisi.

Dal punto di vista genetico, è stata riscontrata una mutazione a livello del gene ATP1A2, sul cromosoma 1. Tale mutazione, p.Tyr1009X, è *nonsense*, rappresenta una cosiddetta mutazione di stop che dà origine ad una proteina alfa2 tronca, con un numero inferiore di aminoacidi, undici per la precisione, rispetto alla forma normale (Gallanti*, Tonelli* et al, 2008).

I geni CACNA1A e SCN1A, comunque sequenziati ed analizzati, sono risultati negativi per la presenza di mutazioni.

La mamma della paziente, unica parente in Italia, è stata sottoposta ad indagine genetica ed è risultata negativa per mutazioni a livello dei 3 geni testati (ATP1A2, CACNA1A, SCN1A).

Capitolo 5-DISCUSSIONE

Dalle prime osservazioni di Clark (1910) ad oggi, sono state descritte più di 150 famiglie di individui affetti da emicrania emiplegica familiare ma, trattandosi di una patologia rara e poco conosciuta, non è a tutt'oggi nota la sua esatta prevalenza nella popolazione generale, verosimilmente sottostimata. Complica il discorso il fatto che sempre più frequentemente vengano descritte anche forme definibili come sporadiche, data l'assenza di una storia familiare, ma comunque associate a mutazioni di uno dei tre geni causa della forma familiare ovvero il CACNA1A, l'ATP1A2 e l'SCN1A. Dall'altro lato, è sempre più frequente l'osservazione di famiglie con almeno un membro per generazione affetto da emicrania emiplegica ma nelle quali, invariabilmente, non viene riscontrata alcuna mutazione a carico dei geni noti.

In questo lavoro, attraverso la creazione di una biobanca, nata nel 2007 e tuttora in via di sviluppo, oltre ad un tentativo di risposta agli interrogativi di cui sopra, ci si è proposti quanto segue:

- 1) cercare di comprendere l'esatta prevalenza della forma emicranica emiplegica sporadica dopo aver accertato la correttezza della formulazione diagnostica e l'effettiva negatività di un albero genealogico completo per almeno 3-4 generazioni;
- 2) nel caso di mutazione genetica, escludere la sua presenza nei familiari sani o, viceversa, confermare la sua presenza negli altri familiari affetti;
- 3) tentare una correlazione genotipo-fenotipica per meglio comprendere i meccanismi patogenetici sottostanti;
- 4) promuovere studi di tipo funzionale che tentino di chiarire quanto per numerosi Autori costituisce tuttora motivo di discussione, ovvero se l'emicrania emiplegica sia effettivamente una forma emicranica o, piuttosto, costituisca un'entità a sé.

Nel nostro studio, sia nel caso familiare sia nei due casi apparentemente sporadici, sono state riscontrate mutazioni a carico del gene ATP1A2. Tale gene, come già illustrato, codifica per la subunità catalitica della Na⁺/K⁺ ATPasi, espressa prevalentemente a livello neuronale nel neonato e a livello astrocitario e meningeo (pia ed aracnoide) nell'adulto. A differenza di quanto accade per le mutazioni sinora descritte a carico del gene CACNA1A, che comportano una *gain of function*, le mutazioni riportate sinora in letteratura parlano di una *loss of function*, dimostrata dalla completa inibizione dell'attività ATPasica nelle cellule esprimenti il gene mutato.

La Na⁺/K⁺ ATPasi catalizza lo scambio di 3 ioni Na⁺ intracellulari con 2 ioni K⁺ extracellulari per cui il suo corretto funzionamento consente il mantenimento di un gradiente cationico alcalino che viene dissipato dai canali ionici durante il fenomeno di propagazione del potenziale d'azione. E' quindi un enzima eteromero, costituito da una subunità alfa, una subunità beta ed una subunità gamma. Mentre la subunità alfa, di 112 kDa, svolge un ruolo catalitico, la subunità beta ha funzioni regolatorie mentre per quanto riguarda la subunità gamma, ancora poco è noto.

Ad oggi sono state identificate 4 isoforme della subunità alfa, ciascuna delle quali presenta una propria e specifica localizzazione tissutale: l'alfa1 è praticamente ubiquitaria, l'alfa4 è solo a livello testicolare, l'alfa3 è ben rappresentata a livello cerebrale ed infine l'alfa2 è localizzata essenzialmente a livello del muscolo scheletrico e del cervello (sia in neuroni che in astrociti) ma, in misura minore, anche a livello cardiaco, oculare ed adipocitico.

La specifica collocazione della subunità alfa2, come peraltro recentemente descritto in letteratura, suggerisce un suo coinvolgimento anche nell'ingresso degli ioni Ca⁺⁺ a livello cellulare e, più precisamente, nel reticolo endoplasmatico. Ciò trova conforto in un lavoro relativamente recente del 2005, svolto dal gruppo di Segall, e che ha analizzato dal punto di vista funzionale le mutazioni T345A, R649Q ed M731T del gene ATP1A2.

La subunità alfa2 consiste di 10 segmenti transmembrana e di un grande loop citoplasmatico, che connette fra loro il IV ed il V segmento. Sino ad oggi, la maggior parte delle mutazioni descritte è

nella regione codificante per il link intracellulare tra i due segmenti di cui sopra, che costituisce tra l'altro un importante dominio regolatore per il trasporto ionico. Solo pochissime mutazioni, la prima fra queste è la R1002Q, sono state sinora descritte a livello del X segmento.

Due delle tre mutazioni descritte e pubblicate in letteratura nel 2007 (c25T>A/p.Tyr8Asn; c193C>T/p.Arg65Trp) dal nostro Gruppo (*Tonelli, *Gallanti et al), invece, si localizzano, fatto questo insolito, a livello dell'estremità N-terminale del dominio A. Più nel dettaglio, la prima tra le due è una mutazione missense a livello dell'esone 2 mentre la seconda è a livello dell'esone 4.

Le forme di Emicrania Emiplegica Familiare di tipo 2 sinora descritte sono associate a mutazioni a livello della subunità alfa2 del canale. Dal punto di vista funzionale, mentre per le prime due mutazioni (R689Q, M731T) riportate in letteratura (De Fusco et al, 2003) si conclude per un'**aploinsufficienza** dimostrata dal mancato supporto della crescita cellulare in coltura, per una terza mutazione, la T345A, invece, nel contesto di una normale crescita colturale in vitro, è stata documentata una **ridotta affinità per il K+** (Segall et al, 2004).

Nonostante nel nostro caso non siano stati ancora eseguiti studi funzionali, esperimenti condotti nel topo e nel ratto hanno dimostrato che modificazioni della lunghezza e della composizione dell'estremità N-terminale, come nel caso delle suddette mutazioni, si traducono in **una alterazione della specificità cationica e dell'equilibrio conformazionale** della pompa Na⁺/K⁺ ATPasica. A supporto di ciò, ulteriori esperimenti condotti sulle subunità alfa1 ed alfa2 hanno dimostrato che, nel caso di una loro mutazione, si viene a verificare un indebolimento delle interazioni intramolecolari tra l'estremità N-terminale ed altre regioni della catena alfa (Segall, 2003; Daly et al, 1994).

Ammettendo, pertanto, che ciò avvenga anche nel caso delle due mutazioni di cui sopra, l'attacco di emicrania emiplegica, a seguito di stimoli "innocui" per la popolazione generale, non sarebbe qui altro che conseguenza di un più probabile raggiungimento del valore-soglia per la genesi di un'onda di Cortical Spreading Depression, causato del decremento delle concentrazioni intracellulari di Na⁺,

a cui segue un incremento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{++} per un ridotto scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.

Alla luce di quanto sinora esposto circa il prodotto codificato dal gene ATP1A2 , non sorprende che quest'ultimo sia inoltre uno dei principali candidati nell'epilessia del lobo temporale. Addirittura, nel 2003 il gruppo di De Fusco ha descritto una famiglia di individui affetti sia da emicrania emiplegica che da convulsioni benigne infantili, a supporto di quanto già descritto in precedenza da Andermann (1998) e collaboratori riguardo alle associazioni esistenti tra l'emicrania emiplegica e l'epilessia rolandica e benigna del lobo occipitale.

Il gruppo di Tavraz, nel 2009, ha condotto studi funzionali su modelli sperimentali esprimenti alcune mutazioni del gene ATP1A2 e tra queste la R908Q. Ciò che se ne è dedotto riveste notevole interesse poiché per la prima volta si associa alla pompa Na^+/K^+ mutata non una perdita, parziale o completa, della sua funzione, bensì una diminuzione del suo *targeting* a livello della membrana plasmatica, dimostrando, peraltro, anche una certa instabilità proteica *temperatura-dipendente*.

Anche se è possibile dedurre il ruolo svolto dal gene ATP1A2 , se mutato, nella genesi dell'onda di Cortical Spreading Depression, ancora è solo parzialmente noto per quanto riguarda i meccanismi molecolari sottostanti alla propagazione dell'onda stessa.

Le maggiori informazioni derivano dallo studio di modelli animali affetti da emicrania emiplegica familiare (Somjen, 2001) che hanno documentato quanto un incremento locale di K^+ , raggiunto un determinato valore-soglia, porti alla depolarizzazione di terminali presinaptici ed alla successiva attivazione di canali del Ca^{++} del tipo 2.1, voltaggio-dipendenti. A tale evento seguirebbe poi l'attivazione dei recettori NMDA del glutammato che porterebbe ad un'ulteriore depolarizzazione della membrana post-sinaptica e ad un incremento di K^+ nello spazio extracellulare che andrebbe a sommarsi a quello preesistente.

In sintesi, la maggior suscettibilità alla genesi, e progressione, dell'onda di Cortical Spreading Depression sarebbe conseguenza sia di un aumentato rilascio di glutammato a livello sinaptico sia di una minore rimozione del glutammato stesso nonché di K⁺. Nel caso, dunque, di un'alterazione del funzionamento di una pompa Na⁺/K⁺ geneticamente mutata, entrambi questi fenomeni risulterebbero amplificati.

Dal punto di vista clinico, pertanto, l'emigrania emiplegica, associata a mutazioni di uno dei tre geni noti, ed in particolare al gene ATP1A2, è in realtà conseguenza di un duplice meccanismo: da un lato una maggior suscettibilità all'onda di Cortical Spreading Depression e dall'altro una canalopatia, che ne giustificherebbe il parossismo nonché la presenza, in un numero non trascurabile di pazienti, di crisi epilettiche. Infatti, i geni codificanti per le subunità dei canali del Na⁺ e del K⁺ sono stati a lungo considerati i geni responsabili delle sindromi epilettiche ereditarie in quanto causa dell'alterato funzionamento del *gate* e, conseguentemente, di un'aumentata eccitabilità neuronale nelle regioni cerebrali esprimenti i canali mutati.

In generale, le sequenze aminoacidiche dei canali ionici voltaggio-dipendenti sono altamente conservate tra le varie specie, ed alcune regioni, in particolare, lo sono tra il genere umano e la *Drosophila*, confermandone l'importanza.

Ad oggi è noto che mutazioni dei canali ionici sono coinvolte in un considerevole numero di patologie episodiche quali le paralisi periodiche, l'atassia episodica, la sindrome del QT lungo, la discinesia parossistica e l'emigrania emiplegica familiare. Ciò che è estremamente interessante è che mutazioni del medesimo gene possano causare patologie distinte ma, al tempo stesso, differenti mutazioni genetiche possano causare fenotipi identici. Più in dettaglio, mutazioni ad esempio a carico del CACNA1A possono causare sia emigrania emiplegica familiare di tipo 1 (FHM1) sia atassia episodica di tipo 2 sia atassia spinocerebellare di tipo 6 (Ophoff et al, 1996; Zhuchenko et al, 1997) e, nel caso di quest'ultima patologia, è possibile la coesistenza di crisi epilettiche.

Per quanto riguarda il nostro studio che, ribadiamo, è **frutto di un lavoro iniziato nel 2007** per cui, ad alcuni, forse, parzialmente noto, emergono alcuni interrogativi:

- 1) perché individui affetti da emicrania emiplegica sporadica (SHM) sono risultati comunque portatori di mutazioni in uno dei geni coinvolti nelle forme familiari?
- 2) Perché pazienti affetti da emicrania emiplegica familiare non hanno presentato mutazioni a livello di nessuno dei tre geni analizzato (CACNA1A, ATP1A2, SCN1A)?

Per rispondere al primo quesito, l'eziopatogenesi alla base delle forme sporadiche di emicrania emiplegica non è, a tutt'oggi, completamente nota. In uno studio del gruppo di Vahedi del 2000, effettuato su pazienti affetti da SHM, sono state riscontrate mutazioni a carico del gene CACNA1A in 2 dei 3 pazienti che presentavano anche segni cerebellari. Più precisamente, il paziente dei due con emicrania emiplegica e disturbi cerebellari è risultato portatore della mutazione T666M mentre il paziente che, in aggiunta a tali sintomi e segni clinici, presentava anche ritardo mentale, prolungati attacchi emicranici associati a compromissione dello stato di coscienza sino al coma, e crisi epilettiche, è risultato positivo alla mutazione Y1384C.

Uno studio analogo, effettuato su un campione di pazienti SHM di dimensioni inferiori rispetto al precedente, ha evidenziato mutazioni del gene CACNA1A in 2 dei 3 pazienti con segni permanenti di atassia ma in nessuno dei pazienti con assenza di segni cerebellari (Carrera et al, 1999).

A supporto di ciò, vi è un recentissimo lavoro condotto dal gruppo di Ducros (2010) su 25 pazienti, 19 dei quali affetti da emicrania emiplegica sporadica. Tra questi pazienti, quelli con segni neurologici permanenti all'esame obiettivo neurologico (segni essenzialmente cerebellari), sono risultati tutti portatori di mutazioni a livello del gene CACNA1A o del gene ATP1A2 mentre nessuna mutazione è stata rilevata a livello del gene SCN1A.

Nel 2008, invece, Thomsen e collaboratori avevano studiato un campione costituito da 105 pazienti danesi affetti da emicrania emiplegica sporadica, in assenza di qualunque altro disturbo

neurologico, e, in 8 di questi, avevano riscontrato mutazioni genetiche (4 a carico del gene CACNA1A e 4 a carico del gene ATP1A2).

Dal nostro studio, in realtà, è emersa una quanto meno più **stretta associazione tra la forma sporadica di emicrania emiplegica e le mutazioni del gene ATP1A2**. Tale dato, peraltro, non si discosta da quanto dedotto dal gruppo di de Vries (2007) che concludeva, a seguito di un sistematico screening genetico in 29 pazienti affetti da SHM, circa un maggior coinvolgimento di questo gene nelle forme sporadiche di malattia.

Per quanto riguarda il **tipo di mutazioni** descritto, queste svolgono a nostro avviso un ruolo patogenetico per le seguenti motivazioni:

-nei casi sporadici, sono state descritte **SOLTANTO** negli individui affetti, potendo quindi essere riconducibili a mutazioni *ex novo*;

-nei casi familiari, sono risultate assenti nei parenti sani mentre sono state riscontrate anche in **TUTTI** gli altri parenti affetti, dimostrando pertanto, la patogenicità e la trasmissibilità della mutazione stessa.

Per quanto riguarda la **sporadicità** delle mutazioni descritte, invece, va precisato che, mentre sulla prima mutazione si è piuttosto certi, data la completezza e l'affidabilità delle informazioni raccolte dal probando, circa la sporadicità della seconda mutazione sono emersi numerosi dubbi, non avendo il probando da tempo rapporti col padre.

Tuttavia, il tipo di mutazione ed il fenotipo ad essa correlato (difficile pensare che una mutazione *nonsense* possa comportare un fenotipo più lieve negli altri familiari eventualmente portatori), ci indurrebbe ad escludere che la madre del probando, che ha frequentato il marito per una ventina di anni circa prima di interrompere i rapporti, possa non aver mai assistito ad almeno un attacco di

emicrania emiplegica di quest'ultimo, dato che il probando, da quando è seguito presso il nostro Centro, ha presentato almeno 1-2 attacchi all'anno.

Tale considerazione, in sintesi, supporterebbe l'ipotesi di una effettiva sporadicità della mutazione e solleverebbe l'interessante quesito circa la modalità con cui si sia creata ex novo una mutazione *nonsense*. Non solo, seguire nel tempo il probando, che magari un giorno avrà figli a loro volta magari portatori della mutazione e dunque affetti, ci permetterebbe di capire se possa verificarsi un aggravamento del fenotipo, analogamente a quanto accade con il fenomeno dell'*anticipazione* nelle malattie da espansione di triplette, alcune delle quali già condividono una caratteristica importante con alcune forme di emicrania emiplegica (ad esempio la FHM1): il fatto di essere canalopatie.

Relativamente al fenotipo e ad un tentativo di **correlazione genotipo-fenotipica**, a nostro avviso non è un caso che il fenotipo più grave descritto nel nostro studio sia quello della paziente portatrice dell'unica mutazione *nonsense*. Infatti, nonostante non siano stati ancora eseguiti studi funzionali, è intuitivo come una proteina anomala perché tronca possa comportare una *loss of function* maggiore, se non completa, rispetto ad una proteina anomala a causa di una sostituzione aminoacidica. Peraltro, una più grave compromissione della pompa Na⁺/K⁺ ATPasica giustificerebbe la comparsa di crisi epilettiche, assenti in tutti gli altri pazienti portatori di mutazioni del gene ATP1A2 che costituiscono il nostro campione, ma già correlate in letteratura a mutazioni di questo gene e dunque ad altri casi di emicrania emiplegica.

Resta il fatto che questa mutazione, ribadiamo *nonsense*, risulta peculiare rispetto a tutte le altre descritte sinora in letteratura, quasi esclusivamente di tipo *missense*.

Relativamente al fatto che nessuno dei pazienti selezionati abbia presentato mutazioni a carico del gene CACNA1A non ci si stupisce data l'assenza, in tutti, del tipico fenotipo ad esso correlato, spesso predominato da segni cerebellari.

Per quanto riguarda, infine, la totale assenza di mutazioni nei 13 pazienti affetti da emicrania emiplegica familiare, va precisato che i medesimi potrebbero essere in realtà portatori di mutazioni a carico di geni a noi non ancora noti e, pertanto, non sequenziati ed analizzati.

Infatti è proprio per questo motivo, al di là del ricercare mutazioni a carico dei 3 geni noti nel campione di pazienti selezionati, il nostro obiettivo è stato quello di creare una **biobanca** che, col tempo, vorremmo contenesse campioni provenienti da ogni Regione di Italia. Lo scopo è quello, utilizzando risorse e personale ad hoc, di poter ricercare in qualunque momento eventuali mutazioni a carico di altri geni che risulteranno correlati a questa particolare forma emicranica. In questo modo potremmo contribuire a riscrivere pagine relative all'eziopatogenesi, forse solo geneticamente determinata e pertanto così peculiare rispetto alle altre comuni forme emicraniche.

Per realizzare ciò, è necessario che lo studio delle cefalee e dell'emicrania in particolare acquisisca sempre maggiore dignità in ambito scientifico, dignità, peraltro, che almeno a nostro avviso ampiamente merita.

BIBLIOGRAFIA

Athwal BS, Lennox GG. *Acetazolamide responsiveness in familial hemiplegic migraine.* Ann Neurol 1996; 40 (5): 820-1.

Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A et al. *A novel mutation in the ATP1A2 gene causes alternating hemiplegia of childhood.* J Med Gen 2004; 41: 621-8.

Battistini S, Stenirri S, Piatti M et al. *A new CACNA1A gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia.* Neurology 1999; 53 (1): 38-43.

Centonze V, Bruccoli C, Macinagrossa G et al. *Non-familial hemiplegic migraine responsive to naloxone.* Cephalalgia 1983; 3 (2): 125-7.

Chioza B, Wilkie H, Nashef L et al. *Association between the alpha (1 a) calcium channel gene CACNA1A and idiopathic generalized epilepsy.* Neurology 2001 May 8;

Cholet N, Pellerin L, Magistretti PJ et al. *Similar perisynaptic glial localization for the Na,K-ATPase alpha2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex.* Cereb Cortex 2002; 12: 515-25.

Clarke JM. *On recurrent motor paralysis in migraine. With report of a family in which recurrent hemiplegia accompanied the attacks.* Br Med J 1910; 1: 1534-8.

Cooper EC, Jan LY. *Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects and challenges.* Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 4759-66.

Curtain RP, Smith RL, Ovcacic M et al. *Minor head trauma-induced sporadic hemiplegic migraine coma.* Pediatr Neurol 2006; 34: 329-32.

Daly SE, Lane LK, Blostein R. *Functional consequences of amino-terminal diversity of the catalytic subunit of the Na,K-ATPase.* J Biol Chem 1994; 269 (39): 23944-8.

D'Ambrosio R, Gordon DS, Winn HR et al. *Differential role of KIR channel and Na⁺/K⁺ pump in the regulation of extracellular K⁺ in rat hippocampus*. J Neurophysiol 2002; 87: 87-102.

De Fusco M, Marconi R, Silvestri L et al. *Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2*. Nat Genet 2003; 33 (2): 192-6.

Denier C, Ducros A, Vahedi K et al. *High prevalence of CACNA1A truncations and broader clinical spectrum in episodic ataxia type 2*. Neurology 1999; 52 (9): 1816-21.

Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G et al. *Mutation in neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine*. Lancet 2005; 366: 371-7.

Ducros A, Denier C, Joutel A, et al. *The clinical spectrum of families hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channels*. N Engl J Med 2001; 345 (1): 17-24.

Fletcher CF, Tottene A, Lennon VA et al. *Dystonia and cerebellar atrophy in CACNA1A null mice lacking P/Q calcium channel activity*. Faseb J 2001; 15 (7): 1288-90.

Tonelli A*, Gallanti A*,

Gallanti A*, Tonelli A*, Cardin V et al. *A novel de novo nonsense mutation in ATP1A2 associated with sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures* J Neurol Sci 2008 Oct 15; 273 (1-2): 123-6

Gong B, Rhodes KJ, Bekele-Arcuri Z et al. *Type I and type II Na⁺ channel alpha2 subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning and association with auxiliary subunits in rat brain*. J Comp Neurol 1999; 412: 342-52.

Ikeda K, Onaka T, Yamakado et al. *Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice*. J Neurosci 2003; 23: 4667-76.

Ikeda K, Onimaru H, Yamada J et al. *Malfunction of respiratory –related neuronal activity in Na,K-ATPase alpha2 subunit deficient mice is attributable to abnormal Cl-homeostasis in brainstem neurons.* J Neurosci 2004; 24: 10693-701.

Johnston D, Magee JC, Colbert CM et al. *Active properties of neuronal dendrites.* Annu Rev Neurosci 1996; 19: 165-86.

Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJD et al. *Structure and mechanism of Na⁺/K⁺-ATPase: functional sites and their interactions.* Ann Rev Physiol 2003; 65: 817-49.

Joutel A, Bousser MG, Biousse V et al. *A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19.* Nat Genet 1993;5 (1): 40-5.

Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJD. *Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions.* Annu Rev Physiol 2003; 65: 817-49.

Juhaszova M, Blaustein MP. *Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 1800-5.

Jurkat-Rott K, Freilinger T, Dreier JP, et al. *Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants.* Neurology 2004; 62 (10): 1857-61.

Kaube H, Herzog J, Kaufer T et al. *Aura in some patients with familial hemiplegic migraine can be stopped by intranasal ketamine.* Neurology 2000; 55 (1): 139-41.

Koenderink JB, Ziffarelli G, Qiu LY et al. *Na, K-ATPase mutations in familial hemiplegic migraine lead to functional inactivation.* Biochim Biophys Acta 2005; 1669:61-8.

Kordasiewicz HB, Gomez CM. *Molecular pathogenesis of spino-cerebellar ataxia type 6 (SCA6).* Neurotherapeutics 2007; 4: 285-94.

Kaja S, Van de Ven RC, Broos LA et al. *Severe and progressive neurotransmitter release alterations in familial hemiplegic migraine type 1 CACNA1A S218L knock-in mice.* J Neurophysiol 2010 Sept; 104 (3) : 1445-55.

Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL et al. *Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma : role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine.* Ann Neurol 2001; 49 (6): 753-60.

Kors EE, Haan J, Giffin NJ et al. *Expanding the phenotypic spectrum of the CACNA1A gene T666M mutation : a description of 5 families with familial hemiplegic migraine.* Arch Neurol 2003; 60 (3): 684-8.

Luvisetto S, Marinelli S, Panasiti MS et al. *Pain sensitivity in mice lacking the Cav2.1 α 1 subunit of P/Q-type Ca⁺⁺ channels.* Neuroscience 2006; 142: 823-32.

Moseley AE, Lieske SP, Wetzell RK et al. *The Na,K-ATPase alpha2 isoform is expressed in neurons and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice.* J Biol Chem 2003; 278: 5317-24.

Ophoff RA, van Eijk R, Sandkuijl LA et al. *Genetic heterogeneity of familial hemiplegic migraine.* Genomics 1994; 22 (1); 21-6.

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN et al. *Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNA1A.* Cell 1996; 87 (3): 543-52.

Pellerin L, Magistretti PJ. *Glutamate uptake stimulates Na,K-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain.* J Neurochem 1997; 69: 2132-7.

Pietrobon D, Striessnig J. *Neurobiology of migraine.* Nat Rev Neurosci 2003; 4: 386-98.

Pizzorusso T, Shapovalova M, Gherardini L et al. *Facilitation of neuronal Cav2.1 channels and cortical spreading depression in knocking mice with mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and coma after minor head trauma.* 36 Annual Meeting of the Society for Neuroscience: October 14-18, 2006: Atlanta, Ga. Abstract 727.1.

Riant F, De Fusco M, Aridon P et al. *ATP1A2 mutations in 11 families with familial hemiplegic migraine.* Hum Mutat 2005; 26: 281.

Riant F, Ducros A, Pioton C et al. *De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine.* Neurology 2010 Sept 14; 75 (11): 967-72.

Romaniello R, Zucca C, Tonelli A et al. *A wide spectrum of clinical, neurophysiological and neuroradiological abnormalities in a family with a novel CACNA1A mutation.* J Neurol Neurosurg and Psychiatry 2010 Aug; 81 (8): 840-3.

Segall L, Scanzano R, Kaunisto MA et al. *Kinetic alterations due to a missense mutation in the Na,K-ATPase alpha2 subunit cause familial hemiplegic migraine type 2.* J Biol Chem. 2004; 279 (42): 43692-6.

Segall L, Mezzetti A, Scanzano R et al. *Alterations in the alpha2 isoform of Na,K-ATPase associated with familial hemiplegic migraine type2.* Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 11106-11.

Silver K, Andermann F. *Alternating hemiplegia of childhood: a study of 10 patients and results of flunarizine treatment.* Neurology 1993 Jan; 43 (1): 36-41.

Somjen GG. *Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarisation.* Physiol Rev 2001; 81 (3): 1065-96.

Tauraz NN, Durr K et al. *Impaired plasma membrane targeting or protein stability by certain ATP1A2 mutations identified in sporadic or familial hemiplegic migraine.* Channels (Austin) 2009 Mar-Apr 3 (2): 82-7.

Tfelt-Hansen P, Sperling B, Andersen AR. *The effect of ergotamine on human cerebral blood flow and cerebral arteries.* New York: Raven Press, 1991: 339-43.

Thomsen LL, Eriksen MK, Roemer SF, et al. *A population-based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria.* Brain 2002; 125 (6): 1379-91.

Thomsen LL, Eriksen MK, Roemer SF, et al. *An epidemiological survey of hemiplegic migraine.* Cephalalgia 2002; 22 (5): 361-75.

Tonelli A, D'Angelo MG, Salati R et al. *Early onset non fluctuating spinocerebellar ataxia and a novel missense mutation in CACNA1A gene*. J Neurol Sci, 2006 Feb 15; 241 (1-2): 13-17.

Tonelli A*, Gallanti A*, Bersano A et al. *Two novel missense variants in the amino terminus of ATP1A2 associated to familial and sporadic hemiplegic migraine*. Clin Gen 2007; 72: 517-523.

d

Tottene A, Pivotto F, Fellin T et al. *Specific kinetic alterations of human Cav2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma*. J Biol Chem 2005; 280: 17678-86.

Urban MO, Ren K, Sablad M et al. *Medullary N-type and P/Q-type calcium channels contribute to neuropathy-induced allodynia*. Neuroreport 2005; 16: 563-6.

Vanegas H, Schaible H. *Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia*. Pain 2000; 85: 9-18.

Vanmolkot KR, Kors EE, Turk U et al. *Two de novo mutations in the Na⁺/K⁺ ATPase gene ATP1A2 associated with pure familial hemiplegic migraine*. Eur J Hum Genet 2006; 14: 555-60.

Vanmolkot KR, Stroink H, Koenderink JB et al. *Severe episodic neurological deficits and permanent mental retardation in a child with a novel FHM2 ATP1A2 mutation*. Ann Neurol 2006; 59: 310-4.

Yu W, Horowitz SH. *Familial hemiplegic migraine and its abortive therapy with intravenous verapamil*. Neurology 2001; 57 (9): 1732-3.

Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE et al. *Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy*. Nat Neurosci 2006; 9: 1142-9.

Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P et al. *Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamate expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel*. Nat Genet 1997; 15 (1): 62-9.

Ringrazio innanzitutto il Professor Claudio Mariani, per avermi offerto l'opportunità di vivere questa esperienza e di conseguire un risultato tanto sperato.

Un ringraziamento sentito anche alla Sig.ra Lorenzin che, con estrema professionalità e cortesia, mi ha accompagnato in questi anni di Dottorato.

Un ringraziamento speciale al Dottor Andrea Gallanti, con il quale ho condiviso giorno per giorno questo lavoro, a partire dalla scelta e dalla valutazione dei pazienti sino alla stesura delle pagine di questa tesi. E' alla sua intelligenza che devo la passione che in me è nata per la neurologia e per lo studio delle cefalee; è alla sua sensibilità, di spirito e di cuore, che devo la serenità di ogni mio giorno.

Grazie di cuore alla Dottoressa Maria Teresa Bassi e alla Dottoressa Alessandra Tonelli, senza le quali questo lavoro non sarebbe stato possibile. Grazie per tutte le volte in cui, parlando con loro, ho compreso più a fondo l'importanza della Genetica, in questo ambito e nell'ambito della Medicina in generale.

Ringrazio il Professor Gennaro Bussone, perché per Andrea e per me è un Maestro, è un punto di riferimento, è colui che forse, più di ogni altro mondo, comprende la passione, le difficoltà e l'immensa gratificazione che lo studio delle cefalee può dare. Ma lo ringrazio anche e soprattutto perché so che sarà disponibile ad ascoltarmi tutte le volte in cui sentirò il bisogno di parlargli, e saprà consigliarmi con la signorilità che lo contraddistingue.

Un grazie di cuore alla Dottoressa Giuseppina Borutti, insegnante, e amica, non necessariamente in questo ordine: è la collega con cui lavoro più in sintonia perché vediamo la neurologia, il paziente e la vita nello stesso modo.

Grazie al Dottor Emilio Magrotti, per avermi accolta nel suo gruppo sin da subito trattandomi come se fossi stata nel suo Reparto da sempre.

Un ringraziamento al Dottor Carlo Dall'occhio, per tutte le volte in cui mi ha seguito con pazienza, professionalità ed ironia nell'esecuzione dell'Ecocolor Doppler. Un pensiero e un abbraccio forte alle Dottoresse Graziana Valenti e Carla Arbasino: non dimenticherò mai la magia della prima cena insieme a Salice, un momento che il tempo nel mio cuore è riuscito a fermare. Grazie di cuore

anche agli altri medici, ai tecnici e a tutti gli infermieri del Reparto di Neurologia dell'Ospedale di Voghera, con cui ho condiviso 2 anni bellissimi e con cui vorrei dividerne molti altri ancora...

E un grazie a tutte le persone, più o meno speciali, che ho incontrato sinora lungo il mio cammino professionale: le prime perché mi hanno offerto l'opportunità di crescere; le seconde perché, deludendomi, mi hanno insegnato ad essere una persona migliore.