

# ANÀLISI GENÈTICA I MOLECULAR DE LES MIGRANYES HEREDITÀRIES

memòria presentada per:  
**Ester Cuenca León**

Per optar al grau de:  
**Doctora per la Universitat de Barcelona**  
bienni 2000-2002

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del **Dr. Alfons Macaya Ruiz** i el **Dr. Bru Cormand Rifà**, al Laboratori de Neurologia Infantil i Psiquiatria Genètica de la Unitat de Neurologia Infantil de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona.

BARCELONA

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Dr. Bru Cormand Rifà

Ester Cuenca León



El treball que es presenta en aquesta Tesi no ha estat sotmès prèviament per cap altra persona que estigui optant a qualsevol títol universitari, i no ha estat realitzat, escrit o publicat per cap altra persona, a excepció d'on s'indica, amb el degut agraïment, dins d'aquesta.



*I awake with the same pain pretend it's not that bad,  
You have to go to work get up, take a shower  
it will easy up. Stumble to the bathroom throw up!  
Try harder, concentrate! You have to go to work!  
I'll just lie down a minute it will get better the nausea will subside.  
Throb, throb, pound, pound! Another day in bed.  
Call the boss, apologize again. Call the doctor, beg for more drugs.  
Another day wasted drugged into oblivion.  
No I can't go to work. No, Mommy can't play  
No, honey, I can't cook dinner. I can't even move!  
I'm sorry boss, maybe I'll feel like working another day.  
I'm sorry sweetie, maybe I'll feel like playing another day.  
I'm sorry honey, maybe I'll feel like cooking another day.  
I'm sorry self, maybe I'll feel like living SOME DAY!!!!*

**by Sherry Ledford**



## AGRAÏMENTS

---

En primer lloc, una menció molt especial als meus directors de tesi:

A l'**Alfons Macaya**, per ser per damunt de tot un bon mestre, perquè al teu costat sempre tinc la sensació d'estar aprenent, tan se val què estiguis fent o de què estiguis parlant. Gràcies per escoltar-me sempre i defensar la feina ben feta, i per transmetre coneixements. Et vull agrair molt especialment que hagi cregut en mi, que és la raó per la que avui estic aquí i presento aquest treball. Moltes gràcies per donar-me la llibertat i la confiança per decidir el què i com estudiar els temes que han anat sorgint, per muntar el laboratori i per tot el que ha calgut, gràcies per tenir-me sempre present i valorar-me en tot moment. Si mai he estat perduda, decepcionada o desanimada, a nivell científic o personal, sempre has sabut què fer i què dir per canviar-ho, gràcies per tot! **'Els mestres (com tu) tendeixen a l'eternitat, perquè mai saps on s'aturarà la seva influència...'** (Els dimarts amb Morrie, M.Albom).

Al **Bru Cormand**, per donar-me la oportunitat d'entrar al món de la genètica... encara recordo el dia que t'havia de trucar i vaig escriure tot el que et volia dir per telèfon (quins nervis!!), per sort en aquell moment vaig trobar una persona planera i que es posava de part meva, un company de poiata que per 'circumstàncies' només em va durar tres mesos, però vas prometre que sempre que ho necessités estaries a l'altre banda de la línia i del mail i sempre ha estat així, a qualsevol hora del dia i sobretot de la nit. Gràcies per l'interès i la confiança en el projecte i en mi, pel recolzament científic i per estar sempre disposat a comentar resultats o problemes. Gràcies també per escoltar-me, ensenyar-me i haver-me donat la oportunitat de ser aquí. Gràcies pels grans esforços d'última hora.

Al llarg de tots aquests anys, he tingut la sort d'estar en un grup maquíssim, que treballa molt i be, i que per damunt de tot valora les persones.

Al Dr **Manuel Roig**, gràcies Manel per tantes converses sobre qualsevol cosa, sobre ciència i sobre el valor de les petites coses que són importants a la vida. Gràcies sobretot per tantes hores de companyia al soterrani del maternò quan per mi era una necessitat. Gràcies per ensenyar-me quan important és expressar la opinió i sobretot 'saber escoltar', moltes gràcies per la comunicació.

A la **Francina Munell**, per ser un pou de generositat, gràcies a tu i l'Alfons per tota l'ajuda en els moments difícils, us feu estimar. Gràcies també a la **Mireia del Toro**, per la mateixa raó, per preocupar-se quan toca i per tenir sempre paraules d'ànim.

Moltíssimes gràcies als companys de laboratori, als que m'han fet companyia i m'han divertit, als que m'han ensenyat ciència i filosofia de vida, als 'antics', molt especialment al **Nour Loukili**, per la saviesa, la honestedat, l'humor i per tants elogis que sempre has tingut per a mi. A la **Vane Plans**, per tantes converses sobre tot i sobre res, sobre feina i vida, per cuidar-se sempre de mantenir la flama de l'amistat malgrat la distància. Al **Mariano Hurtado**, el de 'Bifurca', porque aunque nos veamos poco, estamos, y sabemos que 'no es lo mismo ser que estar'. A l'**Amàlia Martínez**, pel companyerisme, el carinyo i les estones compartides al bunker. Als de 'sempre', la **Roser Corominas**, pel respecte cap a mi i cap a la meva feina, per tantes converses i discussions, per debatre-ho tot i fer-me pensar en totes les opcions de cada resultat, per l'ajuda incondicional a qualsevol hora, per tantes hores viscudes juntes, de feina i de diversió, per cuidar-me i mimar-me, per les fotos, els vídeos, i sobretot pels dibuixos

(per cert, fa temps que no me'n fas), per les esquiades, les escapades, i un llarg etcètera. I per últim als 'nous', el **Mario Marotta**, per ser el millor company de despatx que he tingut mai (i únic), tranquil, silenciós, carinyós, optimista i amb molt humor, 'un besico'. A l'**Anna Daví**, tècnic, extractora, infermera... 'el corre-caminos', el que necessitis i quan ho necessitis, sempre disposada a donar-ho tot, gràcies infinites també pel TROLEDIC. A la **Marta Ribasés**, per... uff! quantes coses... per recordar-me que la rigurositat en ciència i la responsabilitat a la feina no estan renyades amb la diversió i el bon humor, per les muntanyes de generositat, pel carinyo, per l'inoblidable companyia en el viatge a Tanzània, per les emocions, les converses, la confiança, els consells, per estar sempre disposada a donar un cop de mà. Al **Daniel Carranza**, per la riquesa d'emocions i el plaer de la ironia i sobretot per donar valor a les petites coses, pel romanticisme en la ciència i en la vida, ets un sol, et trobarem a faltar, (el senyor Mora i Riu haurà de fer alguna cosa). A la **Yaris Sarria**, por los cafetitos y las charlas, por el cariño y la confianza. A la Clàudia Ruiz, 'ca fort' pensava que no podia conèixer ningú més despistat que jo. I a la **Cris**, per ser tan impetuosa i contagiar l'alegria, ets una monada. Als estudiants d'estiu, especialment als músics, el **Pau** i el **Xavier**.

Al grup d'Electrofisiologia de la Pompeu, en especial al **Chema** i al **Miguel Valverde** per acollir-me uns dies i deixar-me apropar a la seva feina, per la paciència en les explicacions dels gràfics i per portar a bon port les mutacions identificades en els pacients i esbrinar les conseqüències, per ser també optimistes i apassionats. Gràcies.

Als **pacients**, familiars de pacients i **controls** que voluntàriament han accedit a formar part d'aquest estudi. A les **migranyes**, que per sort son poques, però m'han permès sentir en la pròpia pell el sentiment de frustració i dolor, just per poder entendre. En un principi van ser elles (les crisis) qui em van motivar a embaucar-me amb un projecte d'aquestes dimensions, al qual que he assistit des del seu naixement fins a la realització d'aquests treball i del que crec que no em podré separar mai. A l'**època** en que m'ha tocat viure, per haver tingut la sort d'assistir a la revolució de la genètica, des de la invenció de la PCR al moment històric de la seqüenciació de l'ésser humà, per poder estar tan a prop i sentir que estic on s'ha d'estar, on les coses avancen a una velocitat vertiginosa.

A tots els amics que m'han acompanyat i sempre m'han fet costat i han confiat en mi i en la feina que he dut a terme i han estat comprensius amb la dedicació. Al **Jordi Regàs** que em va acompanyar en la fase inicial i sempre ha tingut paraules d'ànim, a l'**Alex Alcover** que em va acompanyar, ajudar i encoratjar en la última fase, la més difícil. A l'**Albert Arcas**, per ser-hi sempre que el vaig a trobar, i al **Mario Bofill**, per tant que hem compartit en aquest últim any (el primer de l'H<sub>2</sub>O!), a cadascú per aportar el seu granet de sorra, malgrat no ser d'aquest món.

Als meus nebots, la **Clàudia** i el **Toni**, per les cançons, els balls, per les rialles, els jocs, els petons i les enormes abraçades, per recordar-me que vull estar en contacte amb la natura per que vull ensenyar-vos que formem part d'ella, per recordar-me que vaig escollir aquesta carrera per que estimo LA VIDA en el sentit més ampli de la paraula.

Per últim als meus **pares**, a qui no només he d'agrair fer de bons pares i donar-ho tot pels fills, sinó l'haver participat activament en aquest treball. Per passar hores escoltant-me, per l'ajuda amb les figures, per la companyia a les nits, pels consells, per recolzar-me en tot moment malgrat les perspectives econòmiques presents i futures dels científics i per entendre-ho TOT, en tots els aspectes. Gràcies per la confiança i l'amor, sou magnífics.

A tots els que no sortiu citats en aquests agraïments i penseu que hauríeu d'estar, no us importi no ser-hi, esteu a la llista del meu cor, la que realment us agraeix ser-hi, i no te limitacions d'espai.



## PRESENTACIÓ

---

La migranya és un mal de cap primari, episòdic crònic i incapacitant molt comú a la població. Ha estat identificada per la Organització Mundial de la Salut (OMS) entre les principals causes d'incapacitat, ocupant la dinovena posició si considerem ambdós sexes o la dotzena si tenim en compte només dones de totes les edats (2001). Es calcula que provoca la pèrdua de 2 anys de vida de l'individu. Els costos econòmics que genera en termes de medicació i pèrdua de productivitat laboral i els costos emocionals, així com la pèrdua d'oportunitats, són enormes.

Les causes i mecanismes pels quals es genera una crisi de migranya ens són encara força desconeguts, i és per això que un dels objectius principals en la recerca actual en migranya és identificar els gens responsables o de susceptibilitat, que contribuïran a una millor comprensió dels mecanismes fisiopatològics subjacents, tot contribuint a la innovació i millora de les estratègies terapèutiques existents.

La migranya té en general una etiologia complexa, amb la contribució de múltiples gens d'efecte menor i factors ambientals que conjuntament, fixen una determinada predisposició a la patologia. No obstant, hi ha formes rares de migranya en què la causa és monogènica, amb un únic gen d'efecte major que determina l'aparició del fenotip. Aquesta Tesi se centra en aquest darrer grup.



## ABREVIATURES

2TM	canals de K <sup>+</sup> amb dos segments transmembrana
ADN	àcid desoxiribonucleic
AINEs	antiinflamatoris cíclics no esteroidals
BFIC	convulsions infantils familiars benignes (de l'anglès <i>benign familial infantile convulsions</i> )
BM	migranya basilar (de l'anglès <i>basilar migraine</i> )
BPT	torticoli paroxístic benigne del lactant (l'anglès <i>benign paroxysmal torticollis of infancy</i> )
BPV	vertigen paroxístic benigne infantil (de l'anglès <i>benign paroxysmal vertigo of childhood</i> )
Ca <sup>2+</sup>	io calci
Cl <sup>-</sup>	io clorur
CNVs	variacions en el número de còpia (de l'anglès <i>copy number variations</i> )
CPS	síndrome periòdica de la infància (de l'anglès <i>childhood periodic syndrome</i> )
CSD	depressió cortical propagant (de l'anglès <i>cortical spreading depression</i> )
Del	deleció
EA2	atàxia episòdica de tipus 2 (de l'anglès <i>episodic ataxia type 2</i> )
f	fenocòpia
FHM	migranya hemiplègica familiar (de l'anglès <i>familial hemiplegic migraine</i> )
h <sub>2</sub>	heretabilitat
IHS	Societat Internacional de les Cefalees (de l'anglès <i>International Headache Society</i> )
ICHD	critèris internacionals de les cefalees (de l'anglès <i>international criteria of headache disorders</i> )
Ins	inserció
K <sup>+</sup>	ió potassi
Kb	quilobases
kDa	quilodaltons
LCA	anàlisi de classes latents (de l'anglès <i>latent class analysis</i> )
LOD	logaritme en base 10 de la probabilitat de lligament (de l'anglès <i>logarithm of the odds</i> )
MA	migranya amb aura
Mb	megabases
HM	migranya hemiplègica (de l'anglès <i>hemiplegic migraine</i> )
mM	milimolar
mV	milivolts
MO	migranya sense aura
MZ	bessons monozigòtics
DZ	bessons dizigòtics
Na <sup>+</sup>	ió sodi
OMS	Organització Mundial de la Salut
p	nivell de significació, penetració
pb	parells de bases
PCR	reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès <i>polymerase chain reaction</i> )
PKC	proteïna cinasa C (de l'anglès <i>protein kinase C</i> )
RFLPs	polimorfismes de longitud de fragments de restricció (de l'anglès <i>restriction fragment length polymorphism/s</i> )
RR	risc relatiu
SCA	atàxia espinocerebel·losa (de l'anglès <i>spinocerebellar ataxia</i> )
SHM	migranya hemiplègica esporàdica (de l'anglès <i>sporadic hemiplegic migraine</i> )
SNP/SNPs	polimorfisme d'un sol nucleòtid (de l'anglès <i>single nucleotide polymorphisms</i> )
STRPs	polimorfisme repetits en tàndem curts (de l'anglès <i>short tandem repeat polymorphisms</i> )
TNFβ	factor β de necrosi tumoral (de l'anglès <i>tumor necrosis factor β</i> )
VNTRs	número variable de repeticions en tàndem de (de l'anglès <i>variable number of tandem repeats</i> )



# ÍNDEX

---

## INTRODUCCIÓ

---

Introducció històrica

## Capítol 1 Migranya

<b>1.1</b>	<b>Generalitats</b>	<b>5</b>
<b>1.2</b>	<b>Diagnòstic</b>	<b>5</b>
1.2.1	Migranya sense aura (MO, ICHD-1.1)	6
1.2.2	Migranya amb aura (MA, ICHD-1.2)	7
1.2.2.1	Migranya hemiplègica familiar (FHM, ICHD-1.2.4)	8
1.2.2.2	Migranya hemiplègica esporàdica (SHM, ICHD-1.2.5)	8
1.2.2.3	Migranya de tipus basilar (BM, ICHD-1.2.6)	9
1.2.3	Síndromes periòdiques de la infància (CPS, ICHD-1.3)	9
1.2.4	Migranya retiniana (ICHD-1.4)	9
1.2.5	Complicacions de migranya (ICHD-1.5)	9
1.2.6	Probable migranya (ICHD-1.6)	9
<b>1.3</b>	<b>Clínica</b>	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Epidemiologia</b>	<b>11</b>
1.4.1	Prevalença	12
1.4.1.1	Distribució per sexes	12
1.4.1.2	Distribució per categories	12
<b>1.5</b>	<b>Fisiopatologia</b>	<b>13</b>
1.5.1	Estat interictal del cervell	15
1.5.2	Aura	15
1.5.3	Cefalea	16
1.5.4	Sensibilització central	16
1.5.5	Connexió entre l'aura i la cefalea	17
<b>1.6</b>	<b>Tractament</b>	<b>17</b>
1.6.1	Profilaxi	17
1.6.2	Episodi Agut	19
<b>1.7</b>	<b>La càrrega de la malaltia</b>	<b>19</b>
1.7.1	Impacte socioeconòmic	19
1.7.2	Trastorns freqüentment associats a migranya	20

<b>Capítol 2</b>	<b>Canals i canalopaties</b>	<b>21</b>
2.1	Bombes i canals iònics i el seu paper en la senyalització neuronal	21
2.2	Canals de $\text{Ca}^{2+}$ activats per voltatge	24
2.2.1	Canals $\text{Ca}_v2.1$	27
2.2.1.1	Regulació per proteïna G	27
2.2.1.2	Regulació per calci i calmodulina	28
2.2.1.3	Regulació per calci i proteïnes SNARE	28
2.3	Canalopaties	29
2.4	La migranya com a canalopatia	30
<b>Capítol 3</b>	<b>Genètica de la migranya</b>	<b>33</b>
3.1	Heretabilitat: factors genètics vs factors ambientals	33
3.1.1	Estudis familiars	33
3.1.2	Estudis de bessons	33
3.1.3	Model de transmissió genètica	34
3.1.4	La migranya com a síndrome	34
3.2	Estudis genètico-moleculars I: estudis de lligament genètic	35
3.2.1	Gens implicats en migranya hemiplègica familiar (FHM)	36
3.2.1.1	Migranya Hemiplègica Familiar de tipus 1 (FHM <sub>1</sub> )	36
3.2.1.1.1	El gen <i>CACNA1A</i>	37
3.2.1.1.2	La subunitat $\alpha_{1A}$ i el canal $\text{Ca}_v2.1$	37
3.2.1.1.3	Estudis electrofisiològics de les mutacions FHM <sub>1</sub>	38
3.2.1.1.4	Model de ratolí <i>knock-out</i> i el seu paper en l'estudi de mutacions FHM <sub>1</sub>	38
3.2.1.1.5	Model de ratolí <i>knock-in</i> i el seu paper en l'estudi de mutacions FHM <sub>1</sub>	39
3.2.1.2	Altres malalties causades per mutacions en el gen <i>CACNA1A</i>	39
3.2.1.2.1	Atàxia episòdica de tipus 2 (EA <sub>2</sub> )	39
3.2.1.2.2	Atàxia espinocerebel·losa de tipus 6 (SCA <sub>6</sub> )	42
3.2.1.2.3	Epilèpsia idiopàtica generalitzada	42
3.2.1.3	Migranya hemiplègica familiar de tipus 2 (FHM <sub>2</sub> ) i gen <i>ATP1A2</i>	42
3.2.1.4	Migranya hemiplègica familiar de tipus 3 (FHM <sub>3</sub> ) i gen <i>SCN1A</i>	45
3.2.2	Gens implicats en formes comuns de migranya	45
3.2.2.1	Estudis de lligament a <i>loci</i> prèviament identificats en FHM	45
3.2.2.2	Estudis de lligament a altres regions candidates	46
3.2.2.3	Estudis de lligament a nivell genòmic en formes comuns de migranya	47
3.3	Estudis genètico-moleculars II: estudis d'associació	48

<b>Capítol 4 Cercant els gens responsables de la malaltia</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Els elements imprescindibles</b>	<b>51</b>
<b>4.1.1 Pacients</b>	<b>51</b>
<b>4.1.2 Marcadors genètics</b>	<b>51</b>
4.1.2.1 Marcadors microsatèl·lits (STRPs) vs polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs)	52
<b>4.1.3 Desequilibri de lligament</b>	<b>53</b>
<b>4.1.4 Mètodes estadístics</b>	<b>53</b>
4.1.4.1 Anàlisi de lligament	53
4.1.4.2 Estudis d'associació	55
<b>4.2 Identificació de gens implicats en malalties complexes</b>	<b>56</b>
4.2.1 El repte d' estudiar malalties complexes	56
4.2.2 Disseny d'estudis per identificar variants de susceptibilitat a la malaltia	57
4.2.2.1 Estratègia dels gens candidats	57
4.2.2.2 Cribratges genòmics	58
<b>4.2.3 Problemes</b>	<b>59</b>
<b>4.2.4 Solucions</b>	<b>60</b>
4.2.4.1 Models monogènics de la malaltia	60
4.2.4.2 Endofenotips	60
4.2.4.3 Models animals	60
4.2.4.4 Poblacions aïllades	60
 <b>OBJECTIUS</b>	 <b>63</b>
 <b>RESULTATS</b>	 <b>67</b>
 <b>Capítol 1 Lligament genètic</b>	 <b>69</b>
"Familial Hemiplegic Migraine: linkage to chromosome 14q32 in a Spanish kindred"	69
Migranya amb aura: lligament a 14q en una família autosòmica dominant extensa	95

<b>Capítol 2 Anàlisi mutacional</b>	107
"Genetic analysis of 27 Spanish patients with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and childhood periodic syndromes"	107
Cribratge mutacional del gen <i>CACNA1A</i> en individus amb Atàxia Episòdica de tipus 2	137
<b>Capítol 3 Hipotèrmia: síndrome periòdica de la infància?</b>	147
"Episodic Spontaneous Hypotermia with Hyperhidrosis in a patient with a novel <i>CACNA1A</i> variant: evidence for a new migraine precursor?"	147
<b>Capítol 4 p.Ala454Tyr: estudis funcionals</b>	169
"A mutation in the first intracellular linker of <i>CACNA1A</i> modifies P/Q channel regulation by CaV $\beta$ subunits, G proteins and syntaxin-1A under conditions of high electrical activity"	169
<b>DISCUSSIÓ</b>	219
<b>A. Migranya hemiplègica familiar i migranya amb aura no hemiplègica: lligament genètic al cromosoma 14q32 en dues famílies extenses</b>	222
Expressivitat variable	222
Penetració incompleta, genocòpies i fenocòpies	224
Exclusió de <i>loci</i> de migranya prèviament descrits	224
Anàlisi de lligament genètic a la família FM1	225
Anàlisi de lligament genètic a la família FM2	225
Aspectes metodològics: tipus de marcadors emprats	226
Definició de la regió crítica: solapament dels <i>loci</i> de les famílies FM1 i FM2	227
Comparació amb <i>loci</i> de migranya descrits prèviament	229



<b>B. Anàlisi mutacional i funcional de gens prèviament relacionats amb la migranya</b>	230
El gen <i>CACNA1A</i> i la migranya hemiplègica (HM)	230
El gen <i>CACNA1A</i> i les síndromes periòdiques de la infància (CPS)	231
El gen <i>CACNA1A</i> i l'atàxia episòdica de tipus 2 (EA2)	232
Descripció de les variants <i>CACNA1A</i> identificades	234
Mutacions causants de patologia o polimorfismes neutres?	236
La migranya hemiplègica (HM) i altres gens ( <i>ATP1A2</i> , <i>SCN1A</i> )	237
Heterogeneïtat genètica de la migranya i de l'atàxia episòdica	238
Hipotèrmia episòdica espontània amb hiperhidrosi (ESHH) amb canvi p.Pro1138Ala al gen <i>CACNA1A</i> : un nou precursor de migranya?	239
Canvi p.Ala454Thr al gen <i>CACNA1A</i> : un modulador del fenotip migranyós?	241
Exclusió de <i>loci</i> prèviament relacionats amb la migranya i identificació del canvi p.Ala454Thr al gen <i>CACNA1A</i>	241
Implicacions funcionals del canvi p.Ala454Thr	243
<b>C. Consideracions finals</b>	246
<b>CONCLUSIONS</b>	249
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	253
<b>APÈNDIX</b>	275
<b>Altres trastorns paroxístics</b>	
"Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia and Generalized Seizures: Clinical and Genetic Analysis in a Spanish Pedigree"	277
"Molybdenum Cofactor Deficiency Presenting as Neonatal Hiperekplexia: A Clinical, Biochemical and Genetic Study"	283
Paràlisis periòdica hipercalièmica: presentació de una família espanyola con la mutación p.Thr704Met en el gen <i>SCN4A</i>	289

