

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

**Dipartimento di Pediatria**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO**

**E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE**

**INDIRIZZO: GENETICA BIOCHIMICA E MOLECOLARE**

**CICLO XXII**

**COMORBIDITÀ TRA CEFALEA ED EPILESSIA IN ETÀ EVOLUTIVA:**

**ASPETTI CLINICI E ANALISI MOLECOLARE DEL GENE SCN1A**

**Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso**

**Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Dott. Maurizio Scarpa**

**Supervisore: Ch.mo Prof. Pier Antonio Battistella**

**Dottoranda: Irene Toldo**

*Ad Andrea*

## INDICE

ABBREVAZIONI	5
SUMMARY	6
SOMMARIO	9
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>12</b>
1.1 Le cefalee primarie in età evolutiva	12
1.2 Le sindromi periodiche	18
1.3 Le epilessie nel bambino e nell'adolescente	22
1.4 Le relazioni tra cefalea ed epilessia	23
1.4.1 Caratteristiche cliniche comuni	23
1.4.2 La comorbidità	27
1.4.3 L'emicrania emiplegica	31
1.4.4 Canalopatie ed ipereccitabilità corticale	34
1.5 Il gene SCN1A	38
<b>2. OBIETTIVI</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>41</b>
3.1 LO STUDIO CLINICO	41
3.1.1 Disegno dello studio	41
3.1.2 Soggetti	42
3.1.3 Analisi statistica dei risultati	45
3.2 LO STUDIO GENETICO	46
3.2.1 Pazienti e controlli	46
3.2.2 Estrazione del DNA genomico	46
3.2.3 Controllo della qualità del DNA estratto	47
3.2.4 Amplificazione del DNA mediante PCR	47
3.2.5 High Resolution Melting (HRM)	49
3.2.6 Amplificazione per HRM	53

3.2.7 Analisi mediante HRM	54
3.2.8 Sequenziamento del gene SCN1A	55
<b>4. RISULTATI</b>	<b>57</b>
4.1 LO STUDIO CLINICO	57
4.1.1 Caratteristiche della popolazione generale	57
4.1.2 Soggetti con comorbidità	58
4.2 LO STUDIO GENETICO	66
4.2.1 Analisi del gene SCN1A mediante HRM	66
4.2.2 Andamenti anomali dell'HRM	70
4.2.3 Sequenziamento del gene SCN1A	74
4.2.4 Analisi dei risultati ottenuti	76
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>79</b>
5.1 LO STUDIO CLINICO	79
5.2 LO STUDIO GENETICO	86
<b>6. CONCLUSIONI</b>	<b>90</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>92</b>
<b>8. RINGRAZIAMENTI</b>	<b>108</b>

## ABBREVIAZIONI

C: cinetosi

CSD: cortical spreading depression

CTC: cefalea tensiva cronica

CTE: cefalea tensiva episodica

DA: dolori ricorrenti agli arti

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis

DHPLC: denaturing high-performance liquid chromatography

EA: emicrania addominale

ECA: emicrania con aura

ESA: emicrania senza aura

FHM: emicrania emiplegica familiare

GCRP: calcitonin gene related peptide

GEFS+: epilessie generalizzate con crisi febbrili plus

HRM: high resolution melting

ICHD-II: International Classification of Headache Disorders

IHS: International Headache Society

ILAE: International League Against Epilepsy

NCBI: National Center for Biotechnology Information

SCN1A: neuronal voltage-gated sodium channel, type I, alpha subunit

SMEI: epilessia mioclonica severa dell'infanzia

SNPs: single nucleotide polymorphisms

SSCP: single strand conformation polymorphism

TPB: torcicollo parossistico benigno

VC: vomito ciclico

VPB: vertigine parossistica benigna

## SUMMARY

Migraine and epilepsy are both common neurological disorders and can occur as comorbid conditions. The pathogenesis of the common forms of migraine is not completely understood, while many epilepsy syndromes have been pathogenetically linked to channelopathies. A particular migraine form, the familial hemiplegic migraine, is also due to mutations in genes encoding ion channels and is often associated to epileptic seizures.

The purpose of this study was to analyse in a large series of children and adolescents with headache (1795 subjects) the comorbidity between primary headache and idiopathic or cryptogenic epilepsy and to evaluate the role of the SCN1A gene in cases with comorbidity.

Among the 1795 headache sufferers, there were 1775 subjects diagnosed as primary headache (957 migraine, 686 tension-type headache, 132 other primary headaches) and 20 subjects diagnosed as secondary headache. Fifty-six subjects having comorbidity were selected.

The prevalence idiopathic or cryptogenic epilepsy or unprovoked seizures was 3.1% (56/1795) in headache sufferers and 4.8% (46/957) in migraineurs.

In subjects with comorbidity, the risk of epilepsy was 3.2-times higher in migraineurs (46/56) compared to tension-type headache sufferers (10/56), without a significant difference between migraine with and without aura ( $p=0.89$ ); subjects with epilepsy had a 4.5-fold increased risk of developing migraine than tension-type headache.

In cases with comorbidity, focal epilepsies prevailed (43/56, 76.8%). Migraineurs affected by focal epilepsies (36/56) had a 3-times higher risk of having a cryptogenic epilepsy (27/36, 75%) than an idiopathic epilepsy (9/36, 25%) ( $p=0.003$ ).

In migraine with aura, epilepsy preceded migraine in 71% of cases, thus excluding a causative role for migraine with aura in epilepsy. In cases with comorbidity, migraineurs did not have a major risk of post-ictal headache compared to tension-type headache sufferers ( $p=0.58$ ). Post-ictal headache prevailed in subjects affected by

cryptogenic temporo-occipital epilepsy (11/18, 61%) than the other types of epilepsy. Photosensitivity (7/56, 12.5%) and positive family history for epilepsy (22/56, 39%) were frequent in cases with comorbidity. In our series nobody experienced episodes of migralepsy or ictal epileptic headache.

In conclusions comorbidity between headache and epilepsy is common in children and adolescents and our results confirm a strong association between migraine and epilepsy, without significant difference between migraine with and without aura. Migraine is associated with higher rates of focal epilepsies, in particular cryptogenic epilepsies.

The analysis of the clinical relationship between headache (especially migraine) and epilepsy could contribute to understanding the pathogenetic mechanisms of these two conditions, mainly when they are comorbid. Further studies, based on the present diagnostic criteria of both disorders are needed.

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated the association between polymorphisms of the SCN1A gene and comorbidity between primary headache (especially migraine) and epilepsy.

Five non-synonymous exonic polymorphisms (c.1748A>T of exon 11; c.2656T>C of exon 15; c.3199A>G of exon 16; c.5771G>A of exon 26; c.5864T>C of exon 26) of the SCN1A gene were selected.

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping was performed in 49 patients with comorbidity and 100 healthy non migraineurs controls by using a new technique, the High Resolution Melting (HRM).

Among the five SNPs analyzed, only c.3199A>G of exon 16 was confirmed to be a polymorphism while the other 4 SNPs were not true polymorphisms, because they were not found in the 298 alleles (cases and controls) examined and are not to be further investigated.

We didn't find a statistically significant difference between distribution of c.3199A>G of exon 16 genotypes between cases and controls; therefore our results confirm that the polymorphism c.3199A>G of exon 16 is not associated to pathological phenotypes in

headache sufferers and in migraineurs, similarly to that found in other studies conducted on patients with epilepsy.

We exclude the role of the SCN1A gene in the pathogenesis of comorbidity between headache (especially migraine) and epilepsy.

The SCN1A gene is a major gene in different epilepsies and epilepsy syndromes, and in this field it has to be further investigated. The HRM could be the new methodology, more rapid and efficacious, for molecular analysis of the SCN1A gene.

The development of protocols for more efficient and reliable molecular diagnostics would allow a wider appreciation of the role of the SCN1A gene and of other genes encoding for ion channels in different epilepsies and epilepsy syndromes.



## SOMMARIO

L'emicrania e l'epilessia sono disordini neurologici frequenti e possono essere presenti in comorbidità. La patogenesi delle forme comuni di emicrania non è del tutto chiarita, mentre in diverse sindromi epilettiche è noto il ruolo fisiopatologico delle canalopatie. Anche una particolare forma di emicrania, l'emicrania emiplegica familiare, è dovuta a mutazioni di geni codificanti per canali ionici ed è spesso associata a crisi epilettiche.

Lo scopo di questo studio è di analizzare, in un'ampia casistica di bambini e adolescenti cefalalgici (1795 soggetti), la comorbidità tra cefalea primaria ed epilessia idiopatica o criptogenetica e di valutare il ruolo del gene SCN1A nei soggetti con comorbidità.

Tra i 1795 cefalalgici analizzati, vi erano 1775 soggetti con diagnosi di cefalea primaria (957 emicrania, 686 cefalea tensiva, 132 altre cefalee primarie) e 20 soggetti con diagnosi di cefalea secondaria. Sono stati individuati 56 soggetti con comorbidità.

La prevalenza di epilessia idiopatica o criptogenetica o crisi epilettiche isolate è risultata del 3,1% (56/1795) nei cefalalgici e del 4,8% (46/957) negli emicranici.

Nei soggetti con comorbidità, il rischio di epilessia era 3,2 volte superiore negli emicranici (46/56) rispetto ai soggetti con cefalea tensiva (10/56), senza differenze significative tra emicrania con e senza aura ( $p=0.89$ ); i soggetti con epilessia avevano un rischio 4,5 volte maggiore di presentare emicrania rispetto alla cefalea tensiva.

Nei casi con comorbidità, erano prevalenti le epilessie focali (43/56, 76,8%). Gli emicranici affetti da epilessie focali (36/56) avevano un rischio 3 volte superiore di presentare un'epilessia criptogenetica (27/36, 75%) rispetto ad un'epilessia idiopatica (9/36, 25%) ( $p = 0.003$ ).

Nell'emicrania con aura, l'esordio dell'epilessia precedeva quello dell'emicrania nel 71% dei casi, escludendo pertanto un ruolo causale dell'emicrania con aura nell'epilessia. Nei casi con comorbidità, gli emicranici non avevano un rischio aumentato di cefalea post-critica rispetto ai soggetti con cefalea tensiva ( $p=0.58$ ). La

cefalea post-critica era più frequente nei soggetti con epilessia temporo-occipitale criptogenetica (11/18, 61%) rispetto agli altri tipi di epilessia.

La fotosensibilità (7/56, 12,5%) e la storia familiare positiva per epilessia (22/56, 39%) sono stati frequentemente riscontrati nei casi con comorbidità. Nessuno dei soggetti con comorbidità ha presentato *migraine* o cefalea ictale epilettica.

In conclusione la comorbidità tra cefalea ed epilessia è frequente nei bambini e adolescenti e i nostri risultati confermano che vi è una forte associazione tra emicrania ed epilessia, senza differenze significative tra emicrania con e senza aura. L'emicrania è associata ad una maggiore prevalenza di epilessie focali, in particolare criptogenetiche. L'analisi della relazione clinica tra la cefalea (in particolare emicrania) e l'epilessia potrebbe contribuire alla comprensione dei meccanismi patogenetici di queste due condizioni, soprattutto quando presenti in comorbidità. Sono necessari ulteriori studi, basati sugli attuali criteri diagnostici di entrambi i disturbi.

A nostra conoscenza, questo è il primo studio che ha valutato l'associazione tra i polimorfismi del gene SCN1A e la comorbidità tra cefalea primaria (in particolare l'emicrania) ed epilessia.

Sono stati selezionati cinque polimorfismi esonici non sinonimi (c.1748A>T dell'esone 11; c.2656T>C dell'esone 15; c.3199A>G dell'esone 16; c.5771G> A dell'esone 26; c.5864T> C dell'esone 26) del gene SCN1A.

La genotipizzazione dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) è stata effettuata in 49 pazienti con comorbidità e 100 controlli sani non emicranici utilizzando una tecnica nuova, l'*High Resolution Melting* (HRM).

Dei cinque SNPs analizzati, solo il c.3199A> G dell'esone 16 è stato confermato come polimorfismo, mentre gli altri 4 SNPs non sono veri polimorfismi perché non sono stati trovati in nessuno dei 298 alleli (tra casi e controlli) esaminati, e pertanto non meritano di essere ulteriormente indagati.

Non abbiamo trovato una differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei genotipi del polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 tra casi e controlli; quindi i nostri risultati confermano che il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 non è associato a

fenotipi patologici nei soggetti con cefalea ed emicrania, analogamente a quanto riscontrato in altri lavori condotti su soggetti affetti da epilessia.

Viene escluso un ruolo del gene SCN1A nella patogenesi della comorbidità tra cefalea primaria (in particolare l'emicrania) ed epilessia.

Il gene SCN1A è un gene di primaria importanza nella patogenesi di diverse epilessie e sindromi epilettiche, e in questo campo deve essere ulteriormente indagato. L'analisi HRM potrebbe essere la nuova metodologia, più rapida ed efficace, per l'analisi molecolare del gene SCN1A.

Lo sviluppo di protocolli diagnostica molecolare più efficienti e affidabili potrebbe consentire una più ampia valutazione del ruolo del gene SCN1A e di altri geni codificanti per canali ionici nelle diverse epilessie e sindromi epilettiche.

## 1. INTRODUZIONE

---

### 1.1 Le cefalee primarie in età evolutiva

Le cefalee vengono distinte in cefalee primarie, per le quali il sintomo è anche la malattia e che sono intrinseche al sistema nervoso centrale, e cefalee secondarie, attribuibili direttamente ad un'altra causa, per le quali il sintomo è correlato a patologie del sistema nervoso centrale o sistemiche, come ad esempio neoplasie cerebrali o ipertensione arteriosa. Le cefalee primarie rappresentano circa il 90% dei casi che giungono all'osservazione clinica.

La classificazione dell'*International Headache Society* (IHS) attualmente in uso, la ICHD-II (2004), include i criteri clinici per porre la diagnosi dei vari tipi di cefalea distinti in vari sottocapitoli. Nella classificazione ICDH-II le cefalee primarie (emicrania, cefalea tensiva, cefalea a grappolo e altre cefalee primarie meno comuni) sono definite sulla base del profilo sintomatologico e sul pattern degli attacchi cefalgici (Winner P et al., 2007).

La cefalea è un disturbo molto diffuso nei bambini: infatti ne soffre almeno il 25% e la prevalenza sale al 37% in età scolare. In particolare la prevalenza delle cefalee primarie a 5 anni è del 19,5% (variabile da un minimo del 4,3% in bambini di 3 anni, ad un massimo del 21,9% a 5 anni di età), mentre a 7 anni è compresa tra il 37 e il 51,5%; nell'età compresa tra 7 e 15 anni essa varia dal 57 all'82% (Sillanpaa M et al., 1991; Mortimer J et al., 1992; Raieli V et al., 2005).

Il 40-50% degli adulti affetti da emicrania riconduce i primi sintomi in età evolutiva, ed un'opportuna e precoce terapia conduce ad una remissione o ad un miglioramento di un gran numero di piccoli pazienti, risultato più difficilmente raggiungibile nell'adulto (Guidetti V et al., 1998).

I tipi più frequenti di cefalea primaria, anche nel bambino e nell'adolescente, sono l'emicrania e la cefalea tensiva (Winner P et al., 2007; Lewis DW, 2007).

A seconda degli studi, si stima che nella popolazione pediatrica generale la prevalenza della cefalea tensiva sia pari o di poco superiore a quella dell'emicrania (Tabella 1).

<b>Autore</b>	<b>Età (anni)</b>	<b>Numerosità del campione (N)</b>	<b>Cefalea tensiva (%)</b>	<b>Emicrania (%)</b>
Anttila (Finlandia), 2002	12	1409	12,2	13,6
Ayatollahi (Iran), 2002	11-18	1868	12,1	6,1
Ozge (Turchia), 2003	8-16	5562	24,7	10,4
Laurell (Svezia), 2004	7-15	1850	9,8	11,0
Zwart (Norvegia), 2004	13-18	8255	18,0	7,0
Kaynak (Turchia), 2004	7-21	2226	20,4	-
Barea (Brasile), 1996	10-18	538	72,8	9,9

**Tabella 1:** Prevalenza di cefalea tensiva ed emicrania nei bambini e negli adolescenti in studi di popolazione (Anttila P, 2006).

### L'emicrania

L'emicrania è un disturbo disabilitante che si manifesta con attacchi ricorrenti, spesso severi, di dolore con aumentata sensibilità a stimoli sensoriali (luce, rumore) e di durata variabile da ore a giorni. E' un disturbo molto frequente, con una prevalenza di circa il 4% nei bambini, del 6% negli uomini e del 18% nelle donne; complessivamente la prevalenza *lifetime* dell'emicrania nella popolazione generale varia dal 16 al 21%.

Nei bambini la prevalenza aumenta progressivamente con l'età essendo del 3% tra i 3 e 7 anni, variabile dal 4 all'11% tra 7 e 11 anni, e compresa tra l'8 e il 23% in adolescenza (Winner P et al., 2005). Prima della pubertà la prevalenza dell'emicrania è un po' maggiore nei maschi rispetto alle femmine; in adolescenza l'incidenza e la prevalenza aumentano con l'età più velocemente nelle femmine rispetto ai maschi (Winner P et al., 2005). Tra gli adulti con emicrania il 20% riporta l'inizio dei sintomi prima dei 10 anni, ed il 46% afferma che l'emicrania era iniziata prima dei 20 anni (Olesen J et al., 2006).

La diagnosi di emicrania è clinica e non vi sono *biomarker* specifici. L'elevata prevalenza di emicrania nei bambini e adolescenti richiede una diagnosi il più accurata e appropriata possibile. Gli attuali criteri di classificazione ICHD-II (2004) rappresentano

un miglioramento rispetto a quelli della precedente classificazione IHS del 1988 (Lewis DW, 2007).

Rispetto alla classificazione precedente (1988) in quella attuale (2004), considerando come gold standard l'impressione clinica, la sensibilità dei criteri diagnostici è aumentata dal 21 al 53% per l'emicrania senza aura, e dal 27 al 71% per l'emicrania con aura, mentre la specificità non è cambiata (Lima MM et al., 2005). Inoltre applicando il criterio di durata inferiore (1 ora invece di 2 ore) i criteri ICHD-II permettono di diagnosticare l'emicrania nell'80,8% dei casi (Hershey AD et al., 2005).

I criteri ICDH-II rappresentano un miglioramento nella diagnosi dell'emicrania del bambino perchè tengono conto delle sue caratteristiche peculiari: la possibile localizzazione bilaterale, la minor durata degli attacchi e la difficoltà di descrivere l'aumentata sensibilità a suoni e luci per il cui rilievo ci si deve basare sul comportamento del bambino (Hershey AD et al., 2005).

La classificazione ICHD-II distingue due principali tipi di emicrania: l'emicrania senza aura (ESA) e l'emicrania con aura (ECA).

L'ESA è nettamente più frequente rispetto all'ECA con un rapporto variabile di 1 a 7-10 (Winner P et al., 2005; Lewis DW, 2007). Essa si caratterizza, per lo più, per la comparsa di un dolore unilaterale (ma anche bilaterale) di tipo pulsante, con intensità medio-forte e che interferisce con le normali attività del bambino. La localizzazione unilaterale del dolore è più frequente a partire dall'età adolescenziale. Gli attacchi possono essere più brevi ma più frequenti rispetto agli adulti. Nel bambino, i cambiamenti nel comportamento e dell'umore possono anche rispondere all'item "aggravamento del dolore con le normali attività". L'intensità severa del dolore caratterizza l'emicrania, anche se i bambini possono riferire che il dolore è di entità lieve-media. Nei bambini, i sintomi prodromici più comuni dell'attacco emicranico possono essere aspecifici, quali i cambiamenti del comportamento e dell'umore.

La qualità pulsante del dolore non è una caratteristica specifica della cefalea del bambino (più del 15% dei bambini, specialmente i più piccoli, riferiscono un dolore di tipo gravativo). I sintomi gastrointestinali, soprattutto nausea e vomito, sono tuttavia più

comuni nei bambini che negli adulti. Rispetto all'adulto, nel bambino le caratteristiche tipiche dell'emicrania sono: l'esordio più rapido, la durata e la frequenza degli attacchi inferiore.

Gli attacchi di ECA sono caratterizzati da segni neurologici transitori che precedono o accompagnano la fase algica. I sintomi dell'aura si sviluppano gradualmente e durano da pochi minuti fino ad un'ora. Sono più frequenti i sintomi visivi (scotomi o fosfeni), seguiti dai disturbi sensitivi e dell'eloquio, raramente vi sono deficit motori (in tal caso potendosi diagnosticare come emicrania emiplegica). Sono pochi gli studi prospettici che hanno studiato, in particolare nei bambini, le caratteristiche dell'aura e della fase cefalalgica dell'ECA (Russell MB et al., 1994; Jensen K et al., 1986; Balottin U et al., 1997; Lanzi G et al., 1994).

#### Patogenesi dell'emicrania

I meccanismi patogenetici dell'emicrania non sono stati del tutto chiariti, tuttavia attualmente si ritiene che l'emicrania sia un processo primariamente neuronale e che insorga in individui che presentano una vulnerabilità ereditaria ed una corteccia cerebrale ipereccitabile. Fattori genetici producono alterazioni di canali ionici neuronali (in particolare i canali del calcio), che conducono ad una riduzione della soglia per fattori esterni ed interni in grado di scatenare episodi di cortical spreading depression (CSD). La CSD rappresenta un'onda lenta (2-6 mm/min) di propagazione di eccitazione neuronale seguita da una depressione della normale attività neuronale, associata ad un'oligoemia regionale ed è verosimilmente la fase iniziale cruciale responsabile sia dell'aura emicranica sia dell'attivazione del sistema trigemino-vascolare. Oltre alla oligoemia corticale sostenuta, la CSD è accompagnata da una fuoriuscita di proteine plasmatiche dai vasi durali e da un'attivazione dei terminali afferenti meningei. Il risultato finale è l'attivazione del nucleo trigeminale nel tronco encefalico (Pietrobon D, 2005). Il sistema trigemino-vascolare è coinvolto sia nei sintomi e segni dell'attacco, sia nel meccanismo d'azione dei farmaci in acuto. Un'ampia varietà di stimoli può scatenare la CSD, che a sua volta inizia il processo dell'infiammazione neurogena

localizzata e la sensibilizzazione dei circuiti sia periferici che centrali. Si ritiene che l'aura emicranica, che rappresenta un fenomeno focale somato-sensoriale transitorio, sia causata da una depolarizzazione neuronale regionale e dall'associata oligoemia regionale osservata con la CSD. Studi basati sull'analisi del flusso ematico cerebrale e sull'impiego della stimolazione magnetica transcranica negli emicranici supportano la conclusione che l'aura visiva sia correlata alla CSD (Pietrobon D, 2005).

Tuttavia la maggior parte degli emicranici (ESA) non sperimenta l'aura e questo è in apparente contrasto con l'idea che la CSD sia l'evento primario nella patogenesi dell'emicrania. E' stato ipotizzato che nei soggetti con ESA la CSD avvenga in aree cerebrali silenti; pertanto in tali soggetti non provoca i sintomi dell'aura ma causa semplicemente la fase algica (Pietrobon D, 2005).

I meccanismi considerati responsabili dell'inizio del dolore emicranico sono l'infiammazione neurogena dei vasi meningei e la sensibilizzazione delle fibre afferenti trigeminali centrali e periferiche. La CSD inizia la dilatazione vascolare con uno stravasamento delle proteine plasmatiche dai vasi durali e attiva le afferenti meningei del sistema trigeminale. Questi processi danno avvio all'infiammazione neurogena dei vasi della dura e della pia madre, mediata principalmente dai neuropeptidi e dalla proteina correlata al gene della calcitonina (CGRP) (Olesen J et al., 2006).

Fattori genetici predisponenti hanno un ruolo preponderante nell'emicrania, in particolare nell'ECA (Ducros A et al., 2002). Si ritiene che l'emicrania sia un disturbo multifattoriale in cui sia fattori genetici che ambientali contribuiscono alla patogenesi (Pietrobon D, 2005; Olesen J et al., 2006).



### La cefalea tensiva

La classificazione ICHD-II distingue, in base alla frequenza degli attacchi: la cefalea tensiva episodica infrequente ( $< 1/\text{mese}$ ), la cefalea tensiva episodica frequente ( $> 1/\text{mese}$  e  $< 15/\text{mese}$ ) e la cefalea tensiva cronica ( $> 15/\text{mese}$ ). Il numero minimo di attacchi necessario per la diagnosi è 10. L'elemento distintivo dei criteri diagnostici è l'assenza di caratteristiche emicraniche (unilateralità, qualità pulsante e intensità severa del dolore, nausea o vomito, fonofobia e fotofobia) (Winner P et al., 2006).

La prevalenza della cefalea tensiva varia tra l'11 e il 72,8% nelle varie casistiche pediatriche (Winner P et al., 2005); nei soggetti di età tra i 13 e i 15 anni, la prevalenza è del 12-18% , come riportato in Tabella 1 (Barea L et al., 1996; Zwart JA et al., 2004; Anttila P, 2006).

Le caratteristiche cliniche della cefalea tensiva nei bambini e negli adolescenti sono abbastanza simili a quelle dell'adulto; la durata degli attacchi può variare da 30 minuti fino a 7 giorni. Tuttavia è stato riscontrato che nel 36,7 % dei bambini con cefalea tensiva la durata degli attacchi è inferiore a 30 minuti e che nei bambini l'assenza di caratteristiche emicraniche (es. nausea, vomito) è più specifica rispetto alla localizzazione e alla durata della cefalea (Winner P et al., 2005).

In età evolutiva, può essere difficile distinguere l'ESA dalla cefalea tensiva, ora per la sovrapposibilità di alcuni sintomi, ora perché si possono alternare le due forme; i fattori ritenuti fondamentali per la differenziazione tra le due forme sono la nausea e/o il vomito, la cui presenza favorisce la diagnosi di emicrania. Infatti il vomito è assente nella cefalea tensiva e la nausea si può riscontrare solo nella forma di cefalea tensiva cronica.

I bambini di solito iniziano a presentare una cefalea tensiva all'età di 7 anni. La cefalea può avere frequenza bimensile e durare circa 2 ore. Rispetto all'emicrania, la durata, la frequenza e l'intensità della cefalea tensiva è minore (Anttila P, 2006). La prevalenza di cefalea tensiva cronica (CTC) nei bambini di età compresa tra 5 e 17 anni è di circa 1% (0,9-1,5%). La CTC è il tipo più comune di cefalea cronica in età pediatrica; in un

gruppo di 115 bambini e adolescenti, di età compresa tra 3 e 15 anni, con cefalea cronica quotidiana, l'81% è stato diagnosticato quale CTC (Anttila P, 2006).

La patogenesi della cefalea tensiva è poco conosciuta. Nella CTE c'è un effetto ambientale rilevante mentre nella CTC anche fattori genetici sembrano avere un ruolo; infatti i parenti di primo grado di pazienti con CTC hanno un rischio 3 volte maggiore di CTC rispetto alla popolazione generale. Tuttavia il ruolo di fattori genetici nella CTC è molto minore rispetto all'emigrania e i due disordini rappresentano verosimilmente due entità distinte. Nei bambini sembra esserci una relazione tra cefalea tensiva e stress psicosociale, disturbi psichiatrici, stress muscolare, disfunzione oro-mandibolare o malattie croniche (Anttila P, 2006). Inoltre nei bambini con CTE vengono riportati più frequentemente disturbi somatici rispetto ai coetanei senza cefalea. Nel 50% dei casi di CTC si riscontrano fattori stressanti predisponenti di tipo fisico o psicologico (Anttila P, 2006).

## **1.2 Le sindromi periodiche**

Le sindromi periodiche sono dei disturbi accessuali e ricorrenti, per lo più di tipo algico e/o neurovegetativo, che hanno uno stretto rapporto, probabilmente anche patogenetico, con l'emigrania. Nell'ICHD-II sono state incluse alcune sindrome periodiche, considerate come precursori emigranici:

- emigrania addominale (EA) 1.3.2;
- vomito ciclico (VC) 1.3.1;
- vertigine parossistica benigna (VPB) 1.3.3.

Inoltre nell'appendice della stessa classificazione sono presenti altre due condizioni:

- torcicollo parossistico benigno A 1.3.5;
- emiplegia alternante dell'infanzia A 1.3.4.

Anche se attualmente non inclusi nell'ICHD-II, altri sintomi periodici da tenere in considerazione sono: i dolori ricorrenti agli arti (DA) e la cinetosi (C).

E' ampiamente documentato in letteratura che la prevalenza di emigrania è significativamente aumentata nei bambini con sindromi periodiche (EA, VC, VPB,

DA), e tra queste è maggiore nell'EA, rispetto ai controlli (Olesen J et al., 2006). Per le sindromi periodiche, come per l'emicrania emiplegica familiare, è stato ipotizzato che tali condizioni abbiano come meccanismo patogenetico comune un disordine dei canali ionici, le cosiddette canalopatie (Giffin NJ et al., 2002).

La prevalenza complessiva delle sindromi periodiche è 1,8% nella popolazione generale e 9,8% negli emicranici (Al-Twaijri et al., 2002).

### L'emicrania addominale

Recenti studi hanno confermato la relazione tra l'emicrania addominale e le cefalee di tipo emicranico. L'8% dei bambini in età scolare tra i 5 e i 15 anni riferiscono dolore addominale ricorrente ed il 4% riferisce episodi che soddisfano i criteri per la diagnosi di EA (Abu-Arafeh I et al., 1995). Più recentemente, in uno studio di follow-up di bambini che avevano EA, il 70% di questi soggetti aveva sviluppato cefalea di tipo emicranico rispondente ai criteri IHS rispetto al 20% dei controlli (Dignan F et al., 2001). L'emicrania addominale è un'entità clinica ben definita, correlata all'emicrania e chiaramente distinguibile da altre forme di dolore addominale ricorrente (Symon DNK et al., 2002; Abu-Arafeh I et al., 2000). Si tratta, infatti, di un disturbo ricorrente idiopatico, caratterizzato da attacchi di dolore addominale peri-ombelicale di durata da 1 a 72 ore, con assoluto benessere in fase intercritica. Al dolore, di intensità da moderata a severa, si associano sintomi vasomotori, nausea e vomito.

La base genetica dell'EA non è nota. Studi di popolazione hanno evidenziato un'aumentata prevalenza di emicrania nei bambini con EA e nei parenti di primo grado. Vi è, infatti, accordo tra molti autori che la prevalenza di emicrania sia statisticamente maggiore tra i bambini con EA rispetto ai controlli, suggerendo che entrambe le condizioni possano avere una base genetica comune (Mortimer MJ et al., 1993). Almeno un terzo dei bambini con EA continuano a presentare attacchi di dolore addominale nella tarda adolescenza ed in età giovane adulta, e circa il 50% soffrono di emicrania (Dignan F et al., 2001).

### Il vomito ciclico

E' una condizione che si presenta con attacchi ricorrenti, usualmente stereotipi nel singolo individuo, caratterizzati da nausea intensa, vomito, pallore e letargia. In fase intercritica vi è una completa risoluzione dei sintomi. Il VC usualmente compare nell'infanzia. Circa il 2% dei bambini in età scolare riporta attacchi di vomito inspiegato che soddisfano i criteri IHS (1988) per la diagnosi di VC (Abu-Arafeh I et al., 1995). Studi clinici ed epidemiologici suggeriscono una relazione stretta tra VC ed emicrania. Uno studio di follow-up, di almeno 10 anni, ha mostrato che il 50% dei bambini con VC continuava a presentare attacchi di vomito in adolescenza ed il 46% soffriva di emicrania rispetto al 12% dei controlli (Dignan F et al., 2001).

Nell'EA e nel VC possono riscontrarsi sia anomalie epilettiformi all'EEG sia episodi di perdita di coscienza, come nelle crisi epilettiche (Ölmez A et al., 2006). Nel VC non sono ancora chiari i meccanismi patogenetici; poiché i sintomi ed i possibili trattamenti del VC sono comuni a quelli dell'emicrania, la sindrome del VC è considerata una variante emicranica (Ölmez A et al., 2006).

### La vertigine parossistica benigna

Si tratta di un disturbo probabilmente eterogeneo, caratterizzato da attacchi brevi e ricorrenti di vertigine, che avvengono senza preavviso e si risolvono spontaneamente in bambini per il resto normali. La prevalenza della VPB ad esordio nell'infanzia non è nota, mentre la prevalenza della VBP ad esordio in età prescolare è del 2,6% (Abu-Arafeh I et al., 1995). La VPB ha una stretta relazione con l'emicrania: quest'ultima è molto più frequente nei bambini con VPB e nei parenti di primo grado rispetto ai controlli (Abu-Arafeh I et al., 1995); infatti nei soggetti con VPB la familiarità per emicrania è risultata piuttosto elevata (83%) (Drigo P et al., 2001). Gli elementi a sostegno dell'ipotesi che la VPB sia un precursore o un equivalente emicranico sono: 1) la presenza di familiarità per emicrania in molti soggetti affetti da VPB (Koehler B et al., 1980; Lanzi G et al, 1994; Drigo P et al., 2001); 2) la vertigine è una caratteristica frequente dell'attacco di emicrania sia nei bambini che negli adulti; 3) i risultati positivi

nei test di provocazione della cefalea (nitroglicerina, istamina, fenfluramina) in soggetti con VPB; 4) la maggiore prevalenza di emicrania nei soggetti con VPB (24% vs 10,6%) e di VPB negli emicranici (8,8% vs 2,6%) rispetto ai controlli (Abu-Arafeh I et al., 1995). La prognosi della VPB è spesso benigna con scomparsa degli episodi; molti bambini con VPB sviluppano, tuttavia, emicrania in età successive.

#### Il torcicollo parossistico benigno

Si caratterizza per episodi ricorrenti di inclinazione del capo da un lato, a remissione spontanea. Tale condizione insorge in lattanti e in bambini piccoli nel corso del primo anno di vita. Può evolvere nella VPB o nella EA oppure andare incontro a remissione spontanea. Spesso vi è una storia familiare di cinetosi e/o di emicrania (54,5 %) (Drigo P et al., 2000). Può essere considerato un fattore predisponente allo sviluppo successivo di emicrania ma tale ipotesi va verificata in studi controllati.

#### L'emiplegia alternante dell'infanzia

E' una condizione piuttosto rara rispetto alle altre sindromi periodiche ed è caratterizzata da un'emiplegia episodica che si manifesta in età infantile, in cui l'uno o l'altro lato del corpo sono coinvolti alternativamente. Si associano un'encefalopatia progressiva, altri fenomeni accessuali e ritardo mentale. Questa particolare entità clinica autorizza una valutazione aggressiva per escludere disordini vascolari, difetti congeniti del metabolismo, encefalopatie mitocondriali o sindromi epilettiche. Sono descritte anche delle forme benigne a prognosi favorevole (Chaves-Vischer V et al., 2001).

Il legame con l'emicrania è basato sulla presenza di un'alta incidenza di emicrania nelle famiglie dei soggetti affetti e sui dati del flusso ematico cerebrale, che suggeriscono un meccanismo simile a quello riscontrato nell'emicrania. I meccanismi patogenetici proposti includono canalopatie, difetti mitocondriali, disfunzione del circolo cerebrovascolare; di queste le canalopatie sembrano l'ipotesi più probabile. Il calcio-antagonista flunarizina può risultare efficace nel ridurre la frequenza e la severità degli attacchi. Recentemente sono stati descritti casi familiari di emiplegia alternante con

riscontro di mutazioni del gene ATP1A2 (Kanavakis E et al., 2004; Swoboda KJ et al., 2004; Bassi MT et al., 2004). Inoltre in un soggetto di 10 anni affetto da atassia episodica, crisi epilettiche, emicrania ed emiplegia alternante è stata identificata una mutazione in eterozigosi del gene SLC1A3 (Jen JC et al., 2005).

### **1.3 Le epilessie nel bambino e nell'adolescente**

Fino al 5% della popolazione mondiale può presentare una singola crisi epilettica nel corso della vita ma una diagnosi di epilessia è riservata a coloro che presentano crisi ricorrenti, ovvero almeno due crisi epilettiche spontanee. La prevalenza a livello mondiale dell'epilessia attiva, intesa come persistenza di crisi o assenza di crisi ma con necessità di terapia antiepilettica cronica, è 0,5-1% e non si è modificata nel tempo (<http://www.who.int/topics/epilepsy>).

Secondo la classificazione internazionale delle epilessie (ILAE, 1989), si distinguono le epilessie parziali (o focali) e le epilessie generalizzate; inoltre, a seconda dell'eziologia, le epilessie vengono distinte in epilessie idiopatiche, criptogenetiche o sintomatiche.

Le epilessie parziali idiopatiche comprendono l'epilessia rolandica benigna e le epilessie occipitali tipo Panayiotopoulos e tipo Gastaut; le epilessie generalizzate idiopatiche comprendono l'epilessia con assenze dell'infanzia e l'epilessia con assenze dell'adolescenza. Per la descrizione delle caratteristiche cliniche delle varie epilessie e sindromi epilettiche si rimanda alla letteratura pertinente (ILAE, 1989; Roger W et al., 2002; Engel J Jr, 2006).

In età pediatrica la prevalenza delle epilessie parziali (58%) è maggiore rispetto alle epilessie generalizzate (39%) (Freitag CM et al., 2001); le epilessie criptogenetiche o sintomatiche (59%) sono maggiormente rappresentate rispetto a quelle idiopatiche (31%) (Eriksson KJ et al., 1997). L'epilessia rolandica è il tipo più frequente di epilessia idiopatica nei bambini e rappresenta l'8-23% delle epilessie in età pediatrica (Roger J et al., 2002). La prevalenza dell'epilessia con assenze dell'infanzia è del 10-12,3% in età evolutiva (Roger J et al., 2002).

## **1.4 Le relazioni tra cefalea ed epilessia**

### **1.4.1 Caratteristiche cliniche comuni**

L'emicrania e l'epilessia sono entrambe disordini neurologici cronici con attacchi episodici, con una tipica costellazioni di sintomi che permette di distinguerle. L'emicrania è caratterizzata da attacchi ricorrenti di dolore e sintomi associati. L'epilessia è caratterizzata da attacchi ricorrenti di sintomi neurologici di solito positivi, che spesso progrediscono ad alterazione dello stato di coscienza con convulsioni. Tuttavia numerosi sintomi possono presentarsi in entrambe le condizioni: l'aura, le allucinazioni, le modificazioni dell'umore, del comportamento o della coscienza, i sintomi focali sensitivi o motori ed entrambe le condizioni possono presentarsi con cefalea.

Inoltre un attacco di emicrania e di epilessia sono simili nella sequenza in 4 fasi:

1) Fase prodromica: di solito precede di ore o giorni l'esordio della cefalea nel 60% dei pazienti con ESA e con ECA (Amery WK, 1986). Può essere caratterizzata da un'alterazione dello stato mentale (es. depressione, iperattività, euforia, irritabilità, agitazione), un'alterazione dello stato neurologico (es. fotofobia, fonofobia, o necessità di sbadigliare), o un'alterazione dello stato generale (es. desiderio di cibo, anoressia, diarrea, stipsi o torcicollo). Sintomi premonitori sono stati riportati da pazienti epilettici prima dell'esordio della crisi (Fenwick P, 1998).

2) Fase dell'aura: l'aura emicranica si presenta con sintomi neurologici focali con esordio graduale da 5 a 20 minuti, di durata inferiore a 60 minuti, che precedono l'inizio della cefalea. Generalmente nell'emicrania l'aura è di maggior durata (superiore a 5 minuti) rispetto all'epilessia, tuttavia sono possibili allucinazioni visive di durata inferiore a 5 minuti nell'emicrania e aure visive prolungate nell'epilessia (es. epilessia post-traumatica, epilessia parziale complessa). Tuttavia l'aura epilettica è di solito breve, dura secondi, si sviluppa rapidamente e può associarsi a sintomi insoliti, come una sensazione di paura, déjà vu o jamais vu. Illusioni o allucinazioni visive possono presentarsi in entrambi i disturbi.

Durante una crisi epilettica, i segni neurologici focali possono variare a seconda dell'area cerebrale coinvolta dalla scarica critica.

Nell'emicrania l'aura può essere visiva, o, meno frequentemente, sensitiva (ipoestesia o parestesie), afasica o motoria (quest'ultima solo nella FHM) e i sintomi neurologici possono succedersi in progressione. Di solito precedono la cefalea, tuttavia possono essere contemporanee alla cefalea o non essere seguite da cefalea.

I sintomi visivi dell'emicrania variano da disturbi visivi minori, come fosfeni o scotomi, fino ad auro complesse caratterizzate da teicopsia (i.e., aura scintillante), micropsia, macropsia o palinopsia (i.e, visione continua di un'immagine anche quando questa è lontana). Nell'epilessia, invece, le auro visive normalmente consistono in punti o figure geometriche circolari luminose, variamente colorate (Panayiotopoulos CP, 1999). Gli automatismi sono frequenti nelle crisi parziali complesse e insolite nell'emicrania, come pure i sintomi olfattivi. Tuttavia non è sempre facile distinguere le due condizioni; infatti, la sindrome "Alice nel paese delle meraviglie", caratterizzata da un'alterazione della forma (metamorfopsia) con micropsia e macropsia e da un'alterata percezione del passare del tempo, è stata descritta sia nell'epilessia (temporo-occipitale e parieto-occipito-temporale) che nell'emicrania (Cau C, 1999; Winner P e Lewis D, 2005).

Tra i sintomi visivi positivi, le allucinazioni visive elementari semplici sono frequenti sia nell'ECA che nelle epilessie occipitali (10-47%), mentre gli "spettri di fortificazione" (teicopsie) sono tipici dell'emicrania. Le allucinazioni visive complesse relative alla percezione corporea o alla forma, distanza e posizione degli oggetti nel campo visivo sono più frequenti nell'epilessia.

I sintomi visivi negativi (cecità, emianopsia e offuscamento visivo) sono, invece, più frequenti nell'emicrania.

L'aura sensitiva emicranica consiste in parestesie cheiro-orali con la migrazione dell'intorpidimento dalla mano fino all'avambraccio e alla faccia; solitamente questo avviene contemporaneamente all'aura visiva. La progressione dei sintomi richiede da 5 fino a 60 minuti, contrariamente all'epilessia in cui le parestesie possono durare da



secondi fino a pochi minuti (Silberstein DS et al., 1995).

Disturbi motori focali (paresi transitoria) può essere sia una manifestazione critica che post-critica (paralisi di Todd) oppure caratterizzano l'aura motoria dell'emicrania emiplegica.

3) Cefalea e fase critica: la cefalea è il sintomo predominante nell'emicrania; altri sintomi che si possono associare comprendono difficoltà di memoria e concentrazione, torcicollo, irritabilità, anoressia, capogiri, diarrea e poliuria.

Nell'epilessia la cefalea non è un sintomo frequente e di solito compare nella fase post-critica. La cefalea post-critica (ICDH-II, 7.6.2) è una conseguenza della scarica critica e si osserva frequentemente nelle epilessie occipitali ma può presentarsi anche nelle epilessie parziali o generalizzate. Può avere le caratteristiche della cefalea tensiva ma anche dell'emicrania, soprattutto nei soggetti emicranici. I criteri ICDH-II per la cefalea post-critica richiedono che l'esordio del dolore avvenga entro 3 ore dopo la crisi, con risoluzione entro 72 ore. Circa il 50% dei pazienti epilettici lamentano cefalea post-critica (D'Alessandro R et al., 1987; Shon F et al., 1987; Bernasconi A et al., 2001) benché la prevalenza possa variare in funzione del tipo di epilessia con una maggiore prevalenza nelle epilessie parziali occipitali. In una serie di soggetti epilettici, cefalea di tipo emicranico veniva riferita dal 26% dei soggetti con cefalea post-critica con una maggiore prevalenza nei soggetti affetti da epilessia delle regioni posteriori (occipitale e temporale) rispetto all'epilessia frontale (De Simone R et al., 2007).

Tuttavia i dati della letteratura suggeriscono che la cefalea post-critica è una manifestazione che fa parte della crisi epilettica e la sua incidenza non è influenzata da una storia precedente di emicrania (De Simone R et al., 2007).

La cefalea può comparire, più raramente in fase pre-critica o durante la crisi epilettica ma non è mai un sintomo isolato; infatti, sono sempre associate altre manifestazioni critiche. In alcuni casi l'emicrania con aura può scatenare una crisi epilettica; tale condizione è denominata migralepsy (Andermann FA et al., 1992). La migralepsy è inclusa nell'attuale classificazione ICDH-II (1.5.5), ma la sua collocazione nosografica è ancora molto dibattuta. Nonostante le alterazioni corticali indotte dall'aura emicranica

possano favorire una crisi epilettica in soggetti predisposti, la migralepsy è osservata meno frequentemente rispetto a quanto atteso considerando l'alta comorbidità tra emicrania ed epilessia. In una serie di 412 pazienti con epilessia, le crisi favorite dall'emicrania rappresentavano solo l'1.7% dei casi (Panayiotopoulos CP, 2006). Una prevalenza maggiore riportata in altre casistiche può essere attribuita a diagnosi errate poiché spesso le epilessie occipitali idiopatiche che si manifestano con cefalea post-critica sono confuse con l'ECA o con la migralepsy quando si associano anche manifestazioni extraoccipitali o convulsioni (De Simone R et al., 2007).

Tuttavia nella maggior parte dei pazienti, che presentano epilessia in comorbidità con l'emicrania, gli attacchi di emicrania e le crisi epilettiche non sono correlati temporalmente (Leninger T et al., 2003; De Simone R et al., 2007).

4) Risoluzione: in questa fase il dolore si interrompe e il paziente può lamentare dolorabilità al collo, cambiamenti dell'umore (euforia o depressione) e perdita di energia. In uno studio recente la cefalea peri-ictale si presentava nel 47% dei pazienti con epilessia del lobo temporale ed extratemporale con caratteristiche compatibili con la diagnosi di emicrania. Inoltre i pazienti con epilessia del lobo temporale avevano più frequentemente cefalea ipsilaterale all'esordio della crisi rispetto ai pazienti con epilessia extratemporale (90% vs 12%) (Bernasconi A et al., 2001).

Altri sintomi o segni comuni ad emicrania ed epilessia includono:

a) alterazioni dello stato di coscienza: le manifestazioni ad esordio brusco ed improvviso sono più tipiche dell'epilessia, anche se possono essere presenti nell'emicrania della basilare ICDH-II, 1.2.6). Si tratta di una rara forma di emicrania caratterizzata da attacchi di emicrania con aura in cui i sintomi sono legati a una disfunzione del tronco encefalico e/o ad entrambi gli emisferi, senza disturbi motori; in tale condizione l'alterazione della coscienza insorge più gradualmente, è spesso parziale, di solito non si accompagna a convulsioni e l'EEG è normale o presenta rallentamenti specie sulle regioni posteriori.

b) vomito: nell'emicrania è strettamente associato alla fase algica mentre nell'epilessia il vomito può presentarsi nella fase post-critica di una crisi generalizzata tonico-clonica o costituire una manifestazione critica, come avviene tipicamente nell'epilessia occipitale benigna.

c) EEG: anomalie EEG grafiche intercritiche possono essere presenti in entrambe le condizioni, mentre l'EEG critico è dirimente. Infatti, durante una crisi epilettica esso è caratterizzato da una scarica di parossismi (tipo punte e complessi punta-onda), mentre durante un attacco di emicrania si possono evidenziare all'EEG scariche lente e focali ma non grafoelementi epilettiformi (Andermann F et al., 1987; Piccinelli P et al., 2006).

E' importante conoscere le caratteristiche cliniche comuni all'emicrania e all'epilessia ma anche le caratteristiche distintive per formulare una diagnosi precisa e per identificare correttamente la situazione di comorbidità, quando entrambi i due disturbi sono associati in uno stesso soggetto. L'analisi della comorbidità ha una rilevanza importante dal punto di vista terapeutico poiché numerosi farmaci antiepilettici trovano impiego nella profilassi dell'emicrania; inoltre lo studio della comorbidità ha un interesse dal punto di vista patogenetico, in quanto potrebbe contribuire a chiarire l'eziologia dei due disturbi (Olesen J et al., 2006 ; De Simone R et al., 2007).

#### **1.4.2 La comorbidità**

Quando l'emicrania e l'epilessia si trovano associate in uno stesso soggetto, tale condizione viene denominata "comorbidità". Per comorbidità si intende la presenza di una condizione coesistente aggiuntiva in un paziente con una particolare malattia indice oppure l'associazione non casuale di due disordini (Feinstein AR, 1970). Non vengono considerate secondo tale definizione le condizioni o sindromi che tipicamente si presentano sia con crisi epilettiche sia con cefalea emicranica, come le malformazioni artero-venose, in particolare a livello del lobo occipitale, i traumi cranici severi, la sindrome MELAS o la sindrome di Sturge-Weber.

La relazione di comorbidità tra emicrania ed epilessia non è completamente chiarita e può essere spiegata secondo le seguenti quattro principali modalità (Sacco S et al., 2006):

- 1) la comorbidità può originare come coincidenza o come bias di selezione;
- 2) una condizione può causare l'altra;
- 3) entrambe le condizioni possono essere collegate da fattori di rischio ambientali o genetici comuni;
- 4) gli stessi fattori di rischio ambientali o genetici possono determinare uno stato di eccitabilità cerebrale che produce entrambi i disordini (Lipton RB et al., 1994).

La prima ipotesi prevede una relazione casuale di emicrania ed epilessia, che sembra, però, improbabile considerando che alcune sindromi epilettiche come le epilessie parziali benigne sono osservate più frequentemente in comorbidità (De Romanis F et al., 1991). Se l'associazione dei due disordini fosse puramente casuale, la prevalenza attesa di epilessia sarebbe dell'1% negli emicranici e la prevalenza di emicrania sarebbe del 12% negli epilettici, mentre la letteratura riporta dei dati di prevalenza significativamente maggiori rispetto a quanto atteso sulla base di un'associazione casuale (De Simone R et al., 2007).

Diversi studi epidemiologici indicano un'associazione di emicrania ed epilessia con un'aumentata prevalenza di emicrania nei pazienti con epilessia e viceversa. Infatti la prevalenza di epilessia in pazienti con emicrania varia dall'1 al 17%, con una media di 5,9%; questa percentuale supera largamente quella della popolazione generale che è approssimativamente 0,5-1% (Andermann E et al., 1987; Hauser WA et al., 1991).

La prevalenza complessiva di emicrania nei bambini con epilessia varia dall'8 al 15%; con valori anche maggiori nei bambini con punte centro-temporali all'EEG (63%) e nell'epilessia con assenze (33%) (Andermann E et al., 1987; Hauser WA et al., 1991). Il rischio di emicrania è più che doppio nei soggetti con epilessia sia nei probandi che nei parenti, rispetto alle persone senza epilessia (Lipton RB et al., 1994; Ottman R et al., 1994).

Come seconda ipotesi è stata suggerita una relazione causale unidirezionale, ad esempio nel caso in cui l'emicrania possa causare un'ischemia cerebrale o un danno cerebrale e di conseguenza l'epilessia oppure nel caso della "*migraine*", in cui l'aura emicranica può scatenare una crisi epilettica (1.5.5 ICHD-II) (Bigal ME et al., 2003). Più frequentemente una crisi epilettica scatena un attacco di cefalea post-critica, spesso con caratteristiche emicraniche; in questo caso è stato ipotizzato che l'epilessia possa scatenare l'emicrania mediante l'attivazione del sistema trigemino-vascolare o attraverso meccanismi tronco-encefalici (Bigal ME et al., 2003). Tuttavia l'ipotesi unidirezionale è stata contraddetta da Marks DA et al. (1993), poiché nella maggior parte dei pazienti con emicrania ed epilessia (66/79, 84%) gli attacchi erano completamente indipendenti.

Una terza ipotesi prevede che fattori di rischio ambientali comuni, come ad esempio un trauma cranico, possano causare sia l'emicrania che l'epilessia. Infatti è stato riscontrato un aumentato rischio di emicrania nelle persone con epilessia causata da trauma cranico, tuttavia un aumentato rischio di emicrania è stato riscontrato in ciascun sottogruppo di epilessia, definito in base a tipo di crisi, età di esordio, eziologia e storia familiare (Lipton RB et al., 1994). D'altra parte la presenza di fattori ambientali comuni non spiega l'aumentato rischio di emicrania nei pazienti con epilessia idiopatica e diversi studi hanno documentato l'associazione tra l'emicrania e l'epilessia rolandica e le epilessie occipitali idiopatiche (Andermann F et al., 1998; Andermann F, 2000). La cefalea può essere un sintomo pre-ictale, peri-ictale e/o post-ictale di crisi epilettiche, come anche il vomito. Nelle epilessie occipitali idiopatiche le crisi sono, infatti, spesso caratterizzate da vomito associato a sintomi visivi, crisi focali e cefalea.

L'esistenza di un possibile terreno costituzionale comune tra emicrania ed epilessia è stata, inizialmente, prospettata sulla base della significativa maggiore familiarità positiva per emicrania negli epilettici (28%) e per epilessia negli emicranici (2-3%) (Alvarez G, 1959; Selby G et al., 1960).

L'ipotesi genetica (quarta ipotesi) è stata testata da Ottman R et al. (1994), che aveva

ipotizzato una maggiore incidenza di emicrania nelle famiglie con forme genetiche di emicrania rispetto a quelle con forme non genetiche e che i parenti di pazienti con emicrania ed epilessia avessero un'incidenza aumentata di epilessia rispetto ai parenti di pazienti affetti solo da epilessia. Questa ipotesi non è stata, però, confermata dal loro studio (Lipton RB et al., 1994).

Lavori successivi hanno riportato dati a favore di possibili fattori genetici comuni alle due condizioni. Infatti in alcune famiglie con epilessia temporale idiopatica è stata riscontrata una maggiore prevalenza di emicrania (D'Agostino DM et al., 1998; Gambardella A et al., 2000). Inoltre è stata descritta un'ampia famiglia con diversi soggetti affetti da epilessia del lobo occipitale e temporale, che segregava con una modalità di trasmissione autosomico-dominante e presentava un linkage al locus 9q21-q22; i pazienti epilettici presentavano attacchi di emicrania con aura indipendenti dalle crisi epilettiche (Deprez L et al., 2007).

Inoltre è emersa una stretta associazione tra ECA ed epilessia. Infatti, in uno studio condotto su 134 bambini e adolescenti cefalalgici, vi era un'alta prevalenza di ECA (30.4%) rispetto agli altri tipi di cefalea primaria nei bambini con crisi epilettiche (Piccinelli P et al., 2006). Un altro studio di popolazione caso-controllo ha documentato che il rischio di crisi epilettiche era aumentato nei bambini con ECA e non nei casi con ESA (Ludvigsson P et al., 2006). Inoltre, la frequenza di ECA è risultata significativamente maggiore nei pazienti con comorbidità di epilessia (41%) rispetto ai pazienti solo con emicrania (25.8%) (Leniger T et al., 2003).

Infine considerando la comorbidità come risultato di un'alterazione dell'eccitabilità cerebrale, Leninger T et al. (2003) ha indagato se le caratteristiche cliniche legate alla CSD erano più gravi nei pazienti che presentavano comorbidità. Nonostante la frequenza delle sindromi e delle crisi epilettiche non differisse tra i pazienti affetti solo da epilessia rispetto ai soggetti con comorbidità, l'emicrania con aura, il peggioramento del dolore con l'attività fisica, la fonofobia e la fotofobia erano significativamente più frequenti nei soggetti con comorbidità rispetto ai pazienti con sola epilessia o emicrania. Tali differenze sono a favore dell'ipotesi che il legame tra emicrania ed epilessia sia

basato sulla CSD come espressione di una ipereccitabilità neuronale. L'alterata eccitabilità neuronale può determinare un'aumentata sensibilità alla CSD risultando in una aumentata attivazione delle fibre trigeminali nocicettive e conseguentemente in attacchi emicranici più severi (Leninger T et al., 2003).

Pertanto è probabile che l'alterata soglia di eccitabilità neuronale, coinvolta nell'emicrania e nell'epilessia e dovuta ad alterati livelli di neurotrasmettitori, sia riconducibile a fattori genetici, in particolare ai disturbi dei canali ionici di membrana, le cosiddette canalopatie. L'epilessia e l'emicrania, infatti, condividono parzialmente dei meccanismi patogenetici comuni collegati alla disfunzione di canali ionici; si suppone, pertanto, che le canalopatie possano essere il legame tra l'epilessia e l'emicrania, in particolare quando tali disturbi si presentano in comorbidità.

#### **1.4.3 L'emicrania emiplegica**

L'emicrania emiplegica è un disordine episodico caratterizzato da attacchi di emiparesi o emiplegia che precedono o accompagnano una cefalea con caratteristiche emicraniche. La progressione del deficit motorio è lenta, con tendenza alla "marcia" o alla diffusione. Gli altri sintomi neurologici che si possono associare sono quelli tipici dell'aura emicranica e, come il deficit motorio, possono durare 30-60 minuti; sono seguiti da una cefalea pulsante di intensità medio-forte.

Si possono associare, inoltre, come le forme più comuni di emicrania anche nausea, vomito, fotofobia e fonofobia. Vengono distinte due forme di emicrania emiplegica, una familiare (FHM) ed una sporadica.

I criteri diagnostici, riportati nell'attuale classificazione ICHD-II (2004) sono i seguenti:

A. Almeno 2 attacchi che soddisfino i criteri B e C

B. L'aura comprende deficit motori completamente reversibili e almeno uno dei seguenti:

1. sintomi visivi completamente reversibili, positivi (come luci tremolanti, macchie, linee) e/o negativi (es. perdita del visus)

2. sintomi sensitivi completamente reversibili, positivi (es. "punture di spilli")  
e/o negativi (es. ipoestesia)

3. disturbo del linguaggio di tipo disfasico completamente reversibile

C. La presenza di almeno due delle seguenti caratteristiche:

1. almeno un sintomo dell'aura si sviluppa gradualmente in  $\geq 5$  minuti e/o vari sintomi si susseguono in  $\geq 5$  minuti

2. ogni sintomo dell'aura ha una durata  $\geq 5$  minuti e  $< 24$  ore

3. una cefalea, che soddisfa i criteri B-D per 1.1 Emicrania senza aura, inizia durante l'aura o la segue entro 60 minuti

D. \*Forma sporadica: nessun congiunto di primo o secondo grado soffre di attacchi che soddisfino questi criteri A-E; forma familiare: almeno un congiunto di primo o secondo grado con attacchi che soddisfino i criteri A-E.

E. Non attribuita ad altra condizione o patologia<sup>1</sup>

L'età d'esordio dell'emicrania emiplegica è di solito entro i 30 anni, con una media di 12 anni. La forma familiare segue una trasmissione autosomica dominante. Dati recenti derivanti da studi genetici dell'emicrania consentono oggi una più accurata definizione di FHM (Thomsen LL et al., 2007; Ducros A, 2008). Sono stati identificati, infatti, 3 specifici sottotipi genetici di FHM:

1) FHM1, in cui sono presenti mutazioni del gene CACNA1A sul cromosoma 19;

2) FHM2, in cui sono presenti mutazioni del gene ATP1A2 sul cromosoma 1;

3) FHM3, in cui sono presenti mutazioni del gene SCN1A sul cromosoma 2.

La FHM1 rappresenta circa il 50% dei casi di FHM. Tale forma presenta spesso sintomi comuni all'emicrania di tipo "basilare" in aggiunta a quelli tipici dell'aura, e la cefalea è quasi invariabilmente presente. Durante gli attacchi di FHM1, si possono manifestare disturbi della coscienza (fino al coma), febbre, pleiocitosi nel liquido cerebrospinale e stato confusionale. Gli attacchi possono essere innescati da un trauma cranico lieve. Circa il 50% delle famiglie affette da FHM1 presenta anche atassia cerebellare progressiva cronica, indipendentemente dagli attacchi emicranici. Altri deficit



permanenti che si possono associare includono degenerazione retinica, ipoacusia e nistagmo. Nella FHM1 sono state riscontrate mutazioni del gene CACNA1A (locus 19p13) che codifica per la subunità alfa 1A del sottotipo P/Q specifico dell'encefalo (Ophoff RA et al., 1997); si tratta, pertanto, di canalopatie del canale del calcio. Nella FHM1 le mutazioni riscontrate sono di tipo missenso e sono state individuate alcune correlazioni genotipo-fenotipo. Infatti solo alcune mutazioni sono associate a segni cerebellari transitori o permanenti (R583Q, S218L), la penetranza non è completa, varia dall'86 al 90% a seconda delle mutazioni. L'8% dei pazienti presenta anche crisi epilettiche. E' da segnalare che è stata, inoltre, descritta in famiglie FHM1 l'associazione con il torcicollo parossistico benigno (Giffin NJ et al., 2002; Roubertie A et al., 2008). La FHM1 è allelica con altre malattie neurologiche: l'atassia episodica di tipo 2, in cui le mutazioni sono troncanti, e la SCA-6, in cui l'alterazione del gene consiste in ripetizioni di triplette.

La FHM2 rappresenta il 10-20% dei casi con FHM. Come nella FHM1, in alcuni pazienti con FHM2 gli attacchi sono favoriti da traumi cranici lievi. Oltre al fenotipo FHM puro, in alcune famiglie sono stati riportati soggetti affetti da crisi convulsive infantili familiari benigne (BFIC), ritardo mentale e segni cerebellari, quali atassia, nistagmo e disatria (De Fusco MD et al., 2003; Spadaro M et al., 2004)

Alcuni soggetti con FHM2 possono presentare crisi tonico-cloniche generalizzate, che favoriscono l'attacco di emicrania emiplegica o che si presentano in modo indipendente, oppure assenze. Nella FHM2 le mutazioni a carico del gene ATP1A2 sono prevalentemente di tipo missenso private ma sono state anche riportate mutazioni troncanti o delezioni; la penetranza è dell'87%. Alcune mutazioni si associano a caratteristiche fenotipiche peculiari: la D718N causa attacchi di emicrania emiplegica frequenti e di lunga durata, la P979L può causare attacchi ricorrenti di coma, le mutazioni D718N e la P979L possono predisporre alle crisi epilettiche e al ritardo mentale. Infine il gene ATP1A2 è risultato associato ad un altro tipo di emicrania, non di tipo emiplegico. E' stata, infatti, descritta una famiglia con soggetti affetti da emicrania della basilare con una nuova mutazione missenso (R548H) a carico del gene

ATP1A2 (Ambrosini A et al., 2005).

La FHM3 costituisce una piccola parte dei casi di FHM. Sono state descritte finora poche famiglie FHM con mutazioni a carico del gene SCN1A di tipo missenso. In 3 famiglie FHM descritte ricorre la mutazione Gln1489Lys del gene SCN1A. In una famiglia con una nuova mutazione missenso un soggetto presentava anche atassia.

Almeno il 20% dei casi FHM non presentano tuttavia mutazioni a carico di questi tre geni. E' quindi molto probabile che altri loci siano coinvolti. Secondo alcuni autori, la FHM può costituire un modello per lo studio delle forme comuni di emicrania (Olesen J et al., 2006). E' di notevole interesse oltre all'associazione tra FHM e vari tipi di epilessia anche, come recentemente segnalato, la presenza di alcune sindromi periodiche in famiglie FHM.

#### **1.4.4 Canalopatie ed ipereccitabilità corticale**

Diversi studi sostengono l'ipotesi dell'ipereccitabilità corticale come possibile meccanismo sottostante sia all'esordio dell'emicrania sia alle crisi epilettiche. Diverse vie biochimiche coinvolgenti strutture cellulari possono aumentare o ridurre l'eccitabilità delle membrane neuronali.

Molti tipi di epilessia sono stati associati a mutazioni in geni umani che codificano per subunità dei canali ionici, in particolare dei canali del sodio e del potassio. Le canalopatie ereditarie del sodio causano le epilessie generalizzate con crisi febbrili plus (GEFS+) e l'epilessia mioclonica severa (sindrome di Dravet); le canalopatie del potassio sono responsabili delle epilessie infantili benigne; le canalopatie del recettore dell'acetilcolina causano l'epilessia dominante notturna del lobo frontale (Celesia CG, 2001; Guerrini R, 2006).

Diversamente dall'epilessia, la patogenesi dell'emicrania è meno conosciuta; tuttavia recenti studi sperimentali hanno chiarito, almeno in parte, la patogenesi dell'aura emicranica (Pietrobon D, 2005). Essa è causata dalla cortical spreading depression (CSD) che è un'onda di depolarizzazione associata con un disturbo transitorio

dell'equilibrio ionico (Lauritzen M et al., 1994); si ritiene, pertanto, che l'aura emicranica abbia un'origine corticale (Van den Maagdenberg et al., 2002).

Mutazioni del gene CACNA1A influenzano la CSD mediante un effetto sul rilascio del glutammato, che è un neurotrasmettitore eccitatorio. Il ruolo del glutammato è sostenuto dal fatto che i sintomi dell'aura in pazienti con FHM possono essere aboliti dalla ketamina, che è un antagonista del recettore del glutammato (Kaube H et al., 2000). Alcuni studi hanno evidenziato l'associazione del gene CACNA1A, coinvolto nella FHM1, con l'epilessia generalizzata idiopatica (Chioza B et al., 2001; Jouvenceau A et al., 2001; Chioza B et al., 2002). Mutazioni di tale gene sono state riscontrate in famiglie con soggetti affetti da atassia episodica ed epilessia, senza e con emicrania emiplegica (Imbrici P et al., 2004). Altri studi hanno documentato il coinvolgimento del gene CACNA1A nell'epilessia nell'uomo (Imbrici P et al. 2004; Chioza B et al., 2002).

Il gene ATP1A2, associato alla FHM2, codifica per la subunità  $\alpha 2$  della pompa sodio-potassio. Mutazioni di tale gene sono state trovate in famiglie FHM con convulsioni infantili familiari benigne (BFIC) (De Fusco M et al., 2003; Vankmolkot KR et al., 2003; Wessman M et al., 2004). Le BFIC sono una forma di epilessia rara e benigna, di tipo autosomico dominante, caratterizzata da crisi convulsive parziali non febbrili che iniziano all'età di 3-10 mesi e scompaiono dopo il primo anno di vita.

Mutazioni del gene ATP1A2 sono state identificate in famiglie con emicrania basilare, ECA ed ESA, emiplegia alternante dell'infanzia (Todt U et al., 2005; Ambrosini A et al., 2005; Bassi MT et al., 2004) e forme comuni di emicrania associate ad epilessia parziale criptogenetica (Deprez L et al., 2008).

Il gene SCN1A, associato alla FHM3, risulta maggiormente implicato nella patogenesi di due sindromi epilettiche, le epilessie generalizzate con crisi febbrili plus (GEFS+) e l'epilessia mioclonica severa (sindrome di Dravet) (Guerrini R, 2006). Recentemente tale gene è stato indagato anche in altri tipi di epilessia ed è risultato coinvolto non solo in altre encefalopatie epilettiche ma anche nelle epilessie criptogenetiche, parziali e

generalizzate (Harkin LA et al., 2007) e nella sindrome di Panayiotopoulos (Grosso S et al., 2007; Orrico A et al., 2009).

La dimostrazione del coinvolgimento di geni codificanti per canali ionici anche nelle epilessie parziali criptogenetiche apre nuove prospettive nella comprensione della patogenesi non solo dell'epilessia ma anche della comorbidità con l'emicrania.

Infatti confrontando due gruppi di bambini rispettivamente affetti da epilessia rolandica benigna ed epilessia parziale criptogenetica o sintomatica con un gruppo di controllo senza epilessia è stato riscontrato che i bambini con epilessia rolandica benigna presentavano, rispetto al gruppo di controllo, una maggiore prevalenza di emicrania e di equivalenti emicranici, esclusa la cinetosi; inoltre, tale prevalenza non differiva da quella riscontrata nei bambini con epilessia parziale criptogenetica o sintomatica. Pertanto, le epilessie parziali sono associate con un'aumentata prevalenza di emicrania indipendentemente dall'eziologia (Wirrell EC et al., 2006).

Benchè lo studio dei geni CACNA1A e ATP1A2 in forme familiari di ESA e ECA abbia dato finora risultati negativi (Ducros A et al., 2002; Jen JC et al., 2004; Kirchmann M et al., 2006; Wessman M et al., 2007), è da valutare se i geni implicati nella patogenesi della FHM, compreso il gene SCN1A, siano coinvolti nei soggetti che presentano la comorbidità di emicrania ed epilessia.

Oltre all'emicrania anche le sindromi periodiche, considerate precursori o equivalenti emicranici si presentano con una frequenza maggiore nei soggetti con epilessia rispetto ai controlli (Wirrell EC et al., 2006). Vi è anche una notevole sovrapposizione dal punto di vista clinico tra alcune sindromi periodiche (in particolare il vomito ciclico), l'emicrania e l'epilessia, soprattutto le epilessie occipitali. Inoltre la presenza, in famiglie FHM1, di soggetti con storia di torcicollo parossistico benigno nell'infanzia (Giffin NJ et al., 2002; Roubertie A et al., 2008) e del riscontro di una mutazione del gene CACN1A in un soggetto che ha presentato nell'infanzia il torcicollo parossistico benigno e la vertigine parossistica benigna (Cuenca-Léon E et al., 2008) supporta l'ipotesi che anche le sindromi periodiche condividano con l'emicrania e l'epilessia meccanismi patogenetici comuni, quali le canalopatie.

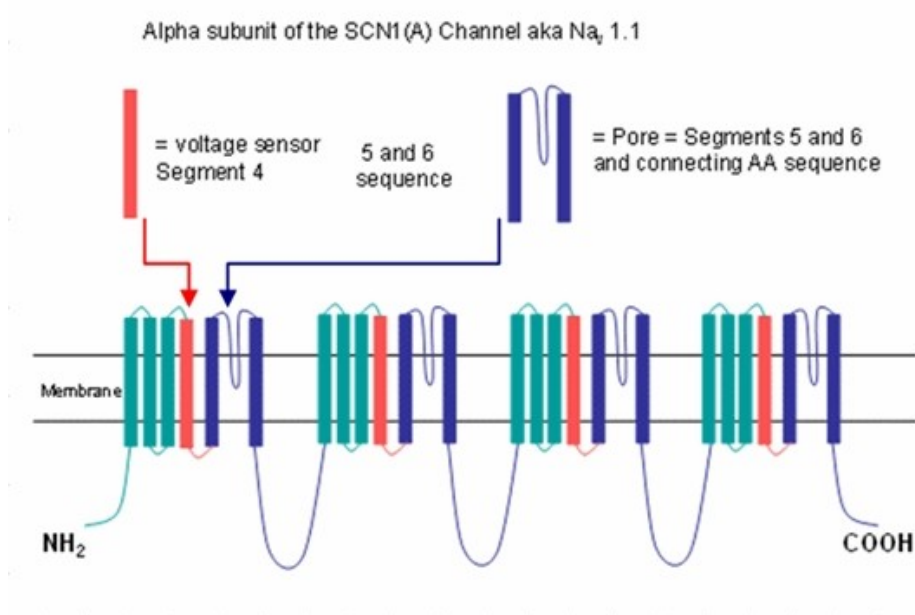
In conclusione il legame fisiopatologico tra emicrania ed epilessia è ancora ignoto. E' possibile che una suscettibilità comune, mediata da fattori genetici condivisi ed in particolare le canalopatie, predisponga ad entrambe le condizioni (Wirrell EC et al., 2006; De Simone R et al., 2007).

Le ricerche attualmente in corso sulla patogenesi di tali disordini, ed in particolare lo studio delle canalopatie, potrebbe indirizzare verso strategie terapeutiche più efficaci per l'emicrania, l'epilessia e altri disordini episodici (come le sindromi periodiche) che condividono, almeno in parte, un'eziologia comune.

## 1.5 Il gene SCN1A

Il gene SCN1A codifica per la subunità alfa del canale del sodio neuronale Nav1.1 (OMIM 182389) e mappa sul locus 2q24; il gene contiene 26 esoni all'interno di una regione genomica di circa 85 Kb (Escayg A et al., 2000). Il canale del sodio è un canale ionico a voltaggio dipendente essenziale per la generazione e la propagazione di potenziali d'azione; esso è costituito da complessi eteromerici formati da un grande poro centrale costituito dalla subunità alfa e da due piccole subunità beta ausiliarie.

La subunità alfa del canale del sodio Nav1.1 ha 4 domini (DI-DIV), ognuno dei quali è formato da 6 segmenti transmembrana (S1-S6) (Figura 1). I segmenti S5 e S6 ed il *loop* compreso tra questi delimitano il poro del canale; il segmento S4 contiene numerosi residui carichi positivamente ed è importante per la sensibilità al voltaggio (Figura 1).



**Figura 1:** Subunità alfa del canale del sodio Nav1.1 codificata dal gene SCN1A.

Le mutazioni del gene SCN1A sono associate a diverse epilessie e sindromi epilettiche, con gravità variabile da lieve come nelle GEFS+ (Escayg A et al., 2000) a sindromi devastanti come l'epilessia mioclonica severa dell'infanzia (Claes L et al., 2001). Poche mutazioni causano l'emigrania emiplegica familiare (Dichigans M et al., 2005).

In Tabella 2 sono elencati i fenotipi clinici finora associati a mutazioni del gene SCN1A (Claes L et al., 2009).

<b>Fenotipi clinici</b>	<b>Referenze</b>
GEFS+	Escayg A et al., 2000
Epilessia mioclonica severa	Claes L et al., 2001
SMEI borderline	Ohmori I et al., 2003
ICEGTC	Fujiwara T et al., 2003
SIMFE	Harkin LA et al., 2007
Altre encefalopatie epilettiche (spasmi infantili, sindrome di Lennox-Gastaut)	Wallace RH et al., 2003 Harkin LA et al., 2007
Epilessie criptogenetiche focali e generalizzate	Harkin LA et al., 2007
Sindrome di Panayiotopoulos	Grosso S et al., 2007
Encefalite di Rasmussen	Ohmori I et al., 2008
Epilessie generalizzate sintomatiche	Marini C et al., 2009
Emicrania emiplegica familiare	Dichgans M et al., 2005

**Tabella 2:** Fenotipi clinici associati al gene SCN1A (Claes L et al., 2009). GEFS+: epilessie generalizzate con crisi febbrili plus; SMEI: epilessia mioclonica severa dell'infanzia; ICEGTC: epilessia intrattabile dell'infanzia con crisi tonico-cloniche generalizzate; SIMFE: epilessia multifocale severa dell'infanzia.

Nel SCN1A *variant data base* ([www.molgen.ua.ac.be/SCN1AMutations/](http://www.molgen.ua.ac.be/SCN1AMutations/)) sono riportate 623 varianti del gene pubblicate. Le varianti patogene sono incluse nella lista delle mutazioni; quando il legame causale tra la variante ed il fenotipo non è chiaramente dimostrato perchè il pattern di segregazione non è stato analizzato, oppure l'amminoacido sostituito non è conservato o i dati funzionali non sono disponibili, la sostituzione viene elencata come variante, mentre quando la variante è osservata nei controlli con una frequenza > 1% viene identificata come polimorfismo (Claes L et al., 2009).

## 2. OBIETTIVI

---

Il primo obiettivo dello studio è l'analisi clinica della comorbidità tra la cefalea primaria, in particolare l'emicrania, e l'epilessia idiopatica o criptogenetica nella casistica afferente al Centro Cefalee dell'età evolutiva del Dipartimento di Pediatria di Padova.

In particolare lo studio si propone di verificare:

- 1) la prevalenza di epilessia idiopatica o criptogenetica nei soggetti affetti da cefalea primaria;
- 2) il tipo di associazione tra cefalea ed epilessia e le possibili correlazioni tra il tipo di cefalea e il tipo di epilessia nei soggetti con comorbidità;
- 3) la familiarità per emicrania o epilessia nei soggetti con comorbidità.

Il secondo obiettivo dello studio è l'analisi molecolare del gene SCN1A nei soggetti con comorbidità tra la cefalea primaria ed l'epilessia idiopatica o criptogenetica e la valutazione del possibile ruolo di tale gene nella patogenesi di tali condizioni, in particolare quando presenti in associazione.



### 3. MATERIALI E METODI

---

#### 3.1 LO STUDIO CLINICO

##### 3.1.1 Disegno dello studio

Si tratta di uno studio di popolazione caso-controllo retrospettivo basato sull'analisi delle cartelle cliniche del Centro Cefalee dell'età evolutiva del Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Padova.

Le cartelle cliniche del Centro Cefalee dell'età evolutiva sono redatte su supporto cartaceo e vengono conservate presso l'archivio del Dipartimento di Pediatria in una sezione dedicata. La cartella clinica, prodotta nel corso della prima visita, viene successivamente aggiornata nel corso dei successivi controlli clinici, effettuati con una cadenza variabile da semestrale ad annuale. Al primo accesso presso l'ambulatorio del Centro Cefalee viene compilata una scheda prestampata denominata "prima visita". Tale scheda permette di raccogliere in modo omogeneo i dati anagrafici, i dati anamnestici e le informazioni cliniche relative al paziente ed ai suoi familiari; inoltre contiene i reperti dell'esame obiettivo e dell'esame neurologico compresa la valutazione del fundus oculi. Nell'anamnesi familiare si pone particolare attenzione alla familiarità per cefalea che, qualora presente, viene indagata dettagliatamente per poter inquadrare il tipo di cefalea in base ai criteri di classificazione delle cefalee attualmente in uso (ICHD-II, 2004).

Nell'anamnesi patologica vengono raccolti i dati relativi a sindromi periodiche, convulsioni febbrili, epilessia, traumi cranici, allergie, sinusiti, trattamenti farmacologici (non per la cefalea) e precedenti ricoveri.

L'anamnesi cefalalgica comprende: età di insorgenza della cefalea, variazioni della sintomatologia negli ultimi sei mesi, frequenza, intensità, durata, sede, lateralizzazione, e qualità del dolore, aggravamento con l'attività fisica, momento di insorgenza nell'arco della giornata. Viene, inoltre, indagata la presenza di sintomi associati alla cefalea:

fotofobia, fonofobia, osmofobia, nausea, vomito, disturbi dell'equilibrio o della parola, alterazioni dello stato della coscienza, deficit sensitivi o motori. Vengono, infine, riportati gli esiti delle visite precedentemente effettuate (oculistica, otorinolaringoiatrica, neurologica, psicologica) o di esami (EEG, radiografie, TAC, RMN) per la cefalea, ed in caso affermativo si raccoglie la relativa documentazione.

Sulla base dei dati raccolti viene posta la diagnosi di cefalea, definendone il tipo in base alla classificazione ICHD-II (2004).

Ad ogni successiva visita di controllo viene compilata una nuova scheda denominata "visita di controllo" che permette di raccogliere i dati relativi all'andamento della cefalea nei mesi precedenti e successivi alla prima visita e alla terapia farmacologica (tipo di terapia, efficacia e tollerabilità).

### **3.1.2 Soggetti**

I soggetti della ricerca sono 1795 pazienti afferenti all'Ambulatorio Cefalee dell'età evolutiva del Dipartimento di Pediatria di Padova nel periodo compreso tra gennaio 1995 e maggio 2008, per i quali la documentazione clinica era reperibile e completa.

Dall'analisi delle cartelle cliniche dei 1795 pazienti, sono stati successivamente selezionati 56 soggetti secondo i seguenti criteri di inclusione e di esclusione:

Criteri di inclusione:

- diagnosi clinica di cefalea primaria secondo i criteri diagnostici della Classificazione Internazionale delle Cefalee (ICHD-II 2004);
- diagnosi di epilessia idiopatica o criptogentica secondo i criteri della Lega Internazionale contro l'epilessia (ILAE, 1989);

Criteri di esclusione:

- diagnosi di cefalea secondaria secondo i criteri diagnostici della Classificazione Internazionale delle Cefalee (ICHD-II 2004);
- diagnosi di epilessia sintomatica secondo i criteri della Lega Internazionale contro l'epilessia (ILAE, 1989).

I dati clinici derivanti dall'analisi delle cartelle cliniche dei 1795 pazienti cefalalgici sono stati inseriti in un data base ("data base cefalee") contenente:

- i dati anagrafici (cognome e nome, data di nascita);
- il tipo di cefalea primaria;
- la presenza ed il tipo di epilessia del probando.

Tra i 1795 pazienti sono stati selezionati, in base ai criteri di inclusione sopra citati, 56 soggetti affetti da comorbidità tra cefalea primaria ed epilessia idiopatica o criptogenetica.

I 56 soggetti affetti da comorbidità sono stati successivamente contattati tramite lettera informativa inviata alle rispettive famiglie; 49 soggetti sono stati rivisti ad un controllo ambulatoriale (41 soggetti nel secondo semestre del 2008 e 8 soggetti nel I semestre del 2009) in occasione del prelievo ematico per lo studio genetico (vedi paragrafo 3.2), mentre nei restanti 7 casi l'aggiornamento anamnestico è stato effettuato solo telefonicamente.

In occasione del controllo ambulatoriale o dell'aggiornamento telefonico sono stati verificati e aggiornati i dati clinici disponibili dalle cartelle cliniche del Centro Cefalee; inoltre è stata approfondita la familiarità (nei parenti di I, II e III grado) per cefalea, epilessia e sindromi periodiche. La raccolta dei dati elettro-clinici dei 56 pazienti è stata effettuata direttamente dai pazienti e dai genitori, e dalle cartelle cliniche dall'archivio informatizzato del Servizio di Neurofisiologia del Dipartimento di Pediatria di Padova dove i soggetti affetti da epilessia vengono seguiti con controlli periodici.

La diagnosi del tipo di cefalea primaria (ESA, ECA, CTE, CTC, altro) e di sindrome periodica (emicrania addominale, vertigine parossistica benigna, vomito ciclico, torcicollo parossistico benigno) è stata effettuata in base ai criteri ICHD-II (2004). E' stata considerata a parte la cinetosi, perchè, pur non essendo attualmente inclusa nella classificazione ICHD-II, è un sintomo frequentemente riportato dai soggetti cefalalgici, in particolare tra gli emicranici (Drigo P *et al.*, 2000; Lanzi G *et al.*, 1983; Barabas G *et al.*, 1983).

La diagnosi del tipo di epilessia idiopatica o criptogenetica è stata posta sulla base dei dati clinici (semeiologia delle crisi epilettiche) e degli accertamenti effettuati (EEG, TAC, RMN) secondo i criteri della Classificazione Internazionale delle Epilessie (ILAE, 1989). Mentre per il probando è sempre stato possibile formulare una diagnosi del tipo di epilessia, per il familiare affetto, invece, soprattutto se il grado di parentela era superiore al primo, le informazioni anamnestiche riportate erano spesso incomplete e, pertanto, sono stati considerati i casi familiari in cui i dati erano sufficienti per stabilire che l'epilessia fosse di tipo non sintomatico.

I diversi tipi di epilessia idiopatica o criptogenetica comprendono (ILAE, 1989):

- 1) epilessie focali criptogenetiche, distinte in epilessia del lobo frontale, temporale, parietale, occipitale in base al lobo di origine della scarica critica;
- 2) epilessie focali idiopatiche (che comprendono l'epilessia rolandica benigna e le epilessie occipitali benigne, altre);
- 3) epilessie generalizzate idiopatiche (che comprendono l'epilessia con assenze dell'infanzia, l'epilessia con assenze dell'adolescenza, l'epilessia con crisi di grande male al risveglio, altre);
- 4) epilessie generalizzate criptogenetiche (che comprendono la sindrome di West, la sindrome di Lennox-Gastaut, altre).

I dati dei 56 soggetti selezionati, secondo i criteri di inclusione, sono stati inseriti in un secondo data base ("data base cefalea-epilessia") contenente:

- 1) i dati anagrafici del probando (cognome e nome, sesso e data di nascita)
- 2) i dati relativi alla cefalea:
  - tipo di cefalea del probando;
  - età di esordio della cefalea;
  - familiarità per cefalea (specificando il tipo di cefalea del familiare e il grado di parentela con il probando);
- 3) i dati relativi all'epilessia:
  - tipo di epilessia del probando;

- per le epilessie parziali criptogenetiche è stato specificato il lobo cerebrale di origine (frontale, temporale, parietale, occipitale);
  - età di esordio dell'epilessia;
  - familiarità per epilessia (specificando il tipo di epilessia del familiare e il grado di parentela con il probando);
- 4) i dati relativi alle sindromi periodiche:
- tipo di sindrome periodica nel probando;
  - familiarità per sindromi periodiche (specificando il tipo di sindrome periodica del familiare).

### **3.1.3 Analisi statistica dei risultati**

Sono state considerate variabili di tipo qualitativo costruendo la distribuzione di frequenza delle singole variabili e le distribuzioni condizionate per la verifica di associazione tra variabili. La funzione test utilizzata è il Chi Quadrato e nell'eventualità di bassa numerosità campionaria il test esatto di Fisher. Si sono, inoltre, calcolate misure di associazione tra variabili espresse mediante l'odds ratio (OR) per il quale si è calcolato anche l'intervallo di confidenza (IC) al 95%. Per ogni test il livello di significatività è stato posto allo 0,05. Le analisi sono state eseguite mediante applicazione del *software* statistico SAS (versione 9.2).

## **3.2 LO STUDIO GENETICO**

### **3.2.1 Pazienti e controlli**

I 56 soggetti, selezionati secondo i criteri di inclusione (paragrafo 3.1), sono stati reclutati mediante lettera spedita a domicilio con allegato il consenso informato. Successivamente i pazienti e i loro genitori sono stati contattati telefonicamente da un medico dedicato allo studio; in tale occasione è stata concordata l'effettuazione del prelievo ematico per l'estrazione del DNA. Il prelievo ematico di 3 ml in EDTA è stato effettuato, previa acquisizione del consenso informato, a 49 pazienti nel periodo maggio-settembre 2008; contemporaneamente al prelievo è stato, anche, effettuato un aggiornamento clinico anamnestico.

Sono stati, inoltre, reclutati 100 soggetti volontari sani non emicranici dal medico dedicato allo studio che ha verificato l'assenza nella storia personale di cefalea con caratteristiche emicraniche e di altre patologie significative. E' quindi stata effettuata l'estrazione di DNA sui campioni di controllo.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

### **3.2.2 Estrazione del DNA genomico**

Il DNA genomico dei pazienti è stato estratto e purificato da 3 ml di sangue intero mediante il PURGENE DNA Purification Kit (Gentra).

Dopo aver aggiunto a 3 ml di sangue 9 ml di soluzione di emolisi, il campione è stato incubato a temperatura ambiente per 20 minuti, e successivamente centrifugato a 2000 g per 10 minuti; il pellet ottenuto è stato risospeso in 1 mL di Hank's e nuovamente emolizzato e centrifugato, in modo da ottenere un pellet di globuli bianchi. Quest'ultimo è stato risospeso in 3 ml di Cell Lysis Solution allo scopo di lisare le cellule. Al lisato cellulare è stato aggiunto 1 ml di Protein Precipitation Solution, il tutto è stato incubato in ghiaccio per 5 minuti e in seguito sottoposto a centrifuga per 10 min a 2000g. Il DNA contenuto nel surnatante, è stato precipitato con 3 ml di isopropanolo 100% mediante

centrifugazione a 2000g per 10 min; il pellet di DNA così ottenuto è stato lavato con 1,5 ml di etanolo 70%, centrifugato per 5 min a 2000g e lasciato asciugare. Infine il DNA è stato risospeso con 250 µl di DNA Hydratation Solution e lasciato ad idratare a 65°C per un'ora e a temperatura ambiente *overnight*.

Ciascun campione è stato quantificato allo spettrofotometro e in seguito conservato a -20°C.

### **3.2.3 Controllo della qualità del DNA estratto**

Il controllo della qualità del DNA estratto viene effettuata attraverso una corsa elettroforetica a 130 Volt per 40 minuti in gel di agarosio allo 1%, preparato facendo sciogliere a caldo 1,5 g di agarosio (BIOPROBE) in 150 ml di TBE 1X (derivato dalla diluizione 1:10 di TBE 10X costituito da 0,90 M Tris Base, 0,90 M acido borico, 0,02 M EDTA; tutti i reagenti sono BDH) a cui poi sono stati aggiunti 7,3 µl di bromuro di etidio (1 mg/ml; BIORAD). Nei pozzetti sono depositati 5 µl di DNA e 2 µl di tracciante *Blue Loading Dye*.

### **3.2.4 Amplificazione del DNA mediante PCR**

Per effettuare la genotipizzazione sono state amplificate le sequenze di interesse del gene SCN1A mediante PCR, utilizzando coppie di *primers* specifiche per ogni amplificato. Sono stati selezionati 5 polimorfismi esonici codificanti non sinonimi del gene SCN1A dallo *SNPs data base dal sito del National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); le caratteristiche dei 5 SNPs sono riportate in Tabella 3. L'esone 26 contiene due diversi polimorfismi, in due diverse regioni dell'esone identificate rispettivamente come esone 26a ed esone 26b.

SNP	Aminoacido	Codice	Eterozigosità	Associazione clinica	Referenza
Esoni 11 c.1748A>T	p.D583V	rs28934003	N.D.	N.N.	NCBI
Esoni 15 c.2656T>C	p.S886P	rs563792	N.D.	N.N.	NCBI
Esoni 16 c.3199A>G	p.T1067A	rs2298771	0.33	ASSENTE eccetto in Lakhan R (2009): più frequente in epilettici vs controlli	Wallace RH, 2001 Malacarne M, 2002 Ohmori I, 2002 Chou IC, 2003 Nabbout R, 2003 Bonanni P, 2004 von Brevern M, 2006 Kwan P, 2008 Lakhan R, 2009
Esoni 26a c.5771G>A	p.R1924H	rs3749029	N.D.	N.N.	NCBI
Esoni 26b c.5864T>C	p.I1955T	rs35735053	0.025	N.N.	Weiss LA, 2003

**Tabella 3:** Caratteristiche dei 5 SNPs del gene SCN1A (N.N.: non noto, N.D.: non determinato).

In Tabella 3 sono riportate il nome del polimorfismo identificato in base all'esone di appartenenza e alla posizione sul cDNA, la sostituzione aminoacidica determinata dal polimorfismo, l'eterozigosità riportata nel data base SNPs del sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). I dati relativi all'associazione clinica sono stati reperiti dal sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e dal sito del *SCN1A variant data base* ([www.molgen.ua.ac.be/SCN1AMutations/](http://www.molgen.ua.ac.be/SCN1AMutations/)).

Dopo aver individuato la posizione dei 5 polimorfismi nella sequenza del gene SCN1A, sono stati disegnati i *primers* con il programma *Primer 3* disponibile *on line* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) tali da amplificare la sequenza di DNA contenente i 5 polimorfismi di interesse. In Tabella 4 sono riportate le sequenze delle coppie di *primers* (*forward* e *reverse*), con le relative temperature di *annealing* ( $T_a$ ) e le dimensioni dell'amplificato.



SNP	PRIMER	AMPLIFICATO	Ta
Esone 11 A1748T	F: GTGGCTCCCTATTTTCACCA R: TGGTCTGACTCAGGTTGCTG	198	62°C
Esone 15 T2656C	F: CTGCGAGTTTTCAAGTTGG R: GATTGTGTCTGCAAGATCGC	182	60°C
Esone 16 A3199G	F: TGGATAGGATGCACAAAGGA R: GAACTGGCAGCAGTGTGAA	233	60°C
Esone 26a G5771A	F: TTCATGGCTTCCAATCCTTC R: CAAAATCAAAGGTGGGGCTA	178	60°C
Esone 26b T5864C	F: GCGAACTGTAAAACAAGCTTCC R: TGACAAAGCCAATTGTGGAA	190	62°C

**Tabella 4:** Primer oligonucleotidici impiegati per amplificare gli esoni contenenti i 5 SNPs del gene SCN1A, dimensione degli amplificati (bp) e temperatura di annealing (Ta).

### 3.2.5 High Resolution Melting (HRM)

I polimorfismi del gene SCN1A sono stati analizzati mediante l'analisi delle curve di melting con *real time*-PCR e sequenziamento diretto effettuati presso il Laboratorio di Genetica del Dipartimento di Pediatria di Padova.

L'*High Resolution Melting* (HRM) è una tecnica innovativa di recente introduzione (2002) con molteplici applicazioni, tra cui:

- ricerca di mutazioni;
- genotipizzazione degli SNPs;
- ricerca della perdita di eterozigotità;
- analisi di metilazione del DNA;
- caratterizzazione degli aplotipi.

Essa permette infatti di distinguere gli ampliconi sfruttando la diversa temperatura di melting delle sequenze, poiché basata sulla lunghezza, la composizione in basi e il contenuto di GC. Quindi può essere usata per rilevare tutti i tipi di variazioni di sequenza del DNA: cambiamenti di singola base (come gli SNPs), inserzioni, delezioni e duplicazioni.

Per l'HRM è stato utilizzato il Rotor-Gene 6000 (Corbett), uno strumento innovativo dotato di un sistema rotante per il rilevamento in tempo reale dell'amplificazione

genetica, utilizzabile per individuare, quantificare e genotipizzare i campioni. Questo dispositivo utilizza un sofisticato sistema di riscaldamento e raffreddamento che risulta in accurati e precisi profili termici, ottenendo ottime condizioni per l'amplificazione e il rilevamento genetico.

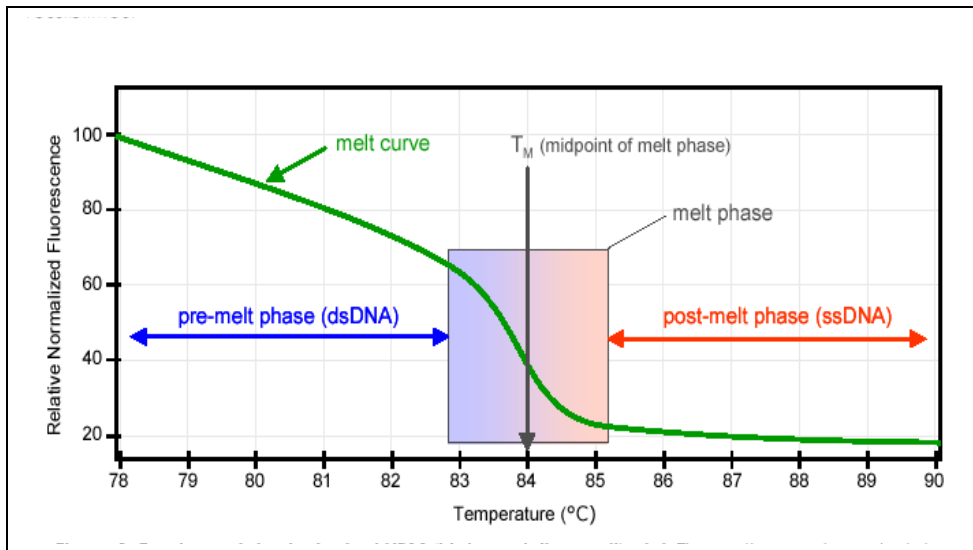
L'innovativo formato rotatorio del Rotor-Gene 6000 rende possibile l'acquisizione di dati qualitativamente ottimi in quanto assicura l'uniformità della temperatura in tutti i campioni, elemento critico in ogni studio molecolare. I campioni ruotano continuamente durante un esperimento alla velocità di 400 rpm. Lo strumento possiede un sistema di rivelazione in fluorescenza per l'analisi e la quantificazione dei prodotti di PCR. I campioni vengono eccitati dal fondo della camera attraverso un LED e l'energia viene trasmessa attraverso la base delle provette. La fluorescenza emessa passa attraverso i filtri di emissione ai lati della camera e viene catturata da un fotomoltiplicatore. Il percorso ottico fisso assicura l'eccitazione uniforme di ogni singolo campione durante la rotazione nella camera.

Questo strumento è collegato ad un computer che tramite un apposito software consente di seguire l'andamento della reazione di amplificazione in tempo reale e di analizzare la curva di melting.

Prima dell'HRM, la sequenza target deve essere amplificata in presenza di un fluoroforo che si lega al DNA a doppia elica ed emette fluorescenza se esposto a fonte luminosa di opportuna lunghezza d'onda (nel presente studio è stato utilizzato l'EvaGreen che se eccitato ad una lunghezza d'onda di 470 nm, emette fluorescenza a 510 nm). Perciò durante la reazione di amplificazione la concentrazione di DNA e quindi la fluorescenza aumentano in maniera esponenziale per poi arrivare rapidamente a plateau intorno al 35°- 40° ciclo.

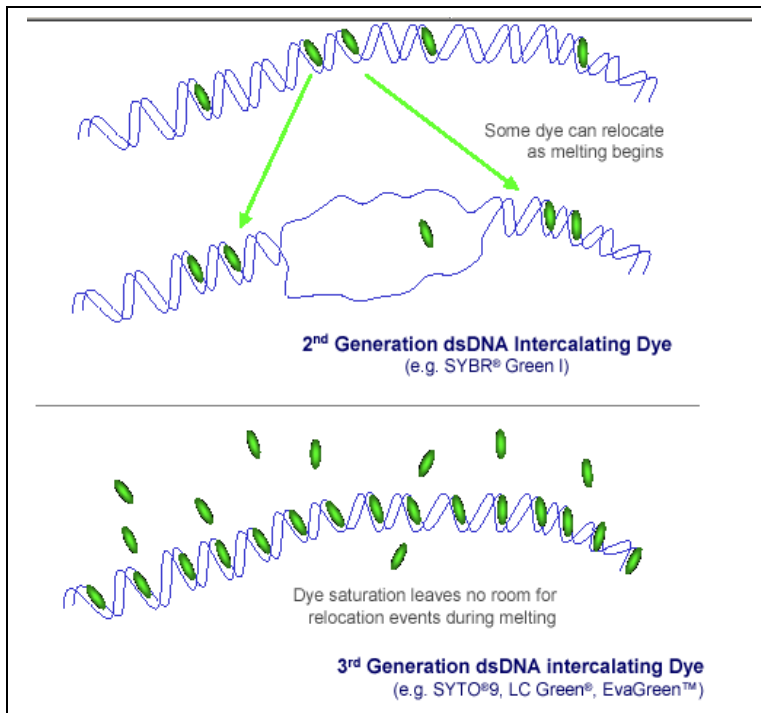
Dopo l'amplificazione, i campioni subiscono una denaturazione progressiva da 70 a 90 gradi e la variazione dell'energia di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di melt (Figura 2). La fluorescenza diminuirà con l'aumentare della temperatura mano a mano che il fluoroforo è rilasciato dal dsDNA (doppia elica) che si dissocia in ssDNA (singola elica).

La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza costituisce la temperatura di melting ( $T_m$ ) alla quale il 50% del DNA si trova in forma denaturata. Ad ogni prodotto di PCR corrisponde una temperatura di melting caratteristica, perciò tramite questo tipo di analisi è possibile distinguere i diversi genotipi.



**Figura 2:** Curve di melt dopo HRM. La curva mostra una diminuzione della fluorescenza con l'aumentare della temperatura mano a mano che il fluoroforo è rilasciato dal dsDNA che si dissocia in ssDNA. Si possono distinguere una fase di pre-melt (in cui la maggior parte del DNA è ancora a doppio filamento) e una fase di post-melt (in cui il DNA è quasi tutto a singolo filamento).  $T_m$  indica la temperatura di melting alla quale il 50% del DNA si trova in forma denaturata (HRM Assay Design and Analysis CorProtocol™ 6000-1-July06).

Ciò che rende questa analisi di melting ad alta risoluzione è l'utilizzo di fluorofori intercalanti il doppio filamento di DNA di terza generazione (introdotti nel 2003). Questi possono essere usati ad alte concentrazioni in modo da saturare il doppio filamento di DNA, senza per questo andare a modificare la temperatura di melting. Una più alta concentrazione di intercalante consente di avere una più alta fedeltà del segnale, perché non c'è una redistribuzione del fluoroforo nelle regioni non ancora denaturate durante la melting, come avviene con i fluorofori di seconda generazione (Figura 3).



**Figura 3:** Ridistribuzione del fluoroforo durante la dissociazione del DNA (White et al., 2006).

Il tempo richiesto per l'HRM con Rotor-Gene 6000 per campione è variabile poiché dipende dal rotore utilizzato e dal numero di campioni caricati; l'intera corsa richiede infatti circa due ore tra amplificazione e dissociazione. Se si utilizza il rotore da 36 (come nel presente studio) si può stimare un tempo di analisi per campione di circa 3 minuti, mentre utilizzando il rotore da 72 questo si riduce fino a circa 1,5 minuti.

Questo tipo di analisi richiede che i frammenti di DNA non siano più lunghi di circa 250 bp. Usando prodotti più lunghi infatti diminuisce la sensibilità a causa dell'aumento della probabilità di formazione di molteplici domini di melting con conseguente complicazione delle curve di melt. L'HRM è quindi in grado di rivelare variazioni all'interno della sequenza del DNA, tuttavia non è in grado di caratterizzarle; per questo si procede al sequenziamento diretto.

L'HRM è stata utilizzata per identificare i 5 polimorfismi selezionati localizzati in 4 diversi esoni del gene SCN1A. Sono stati, pertanto, opportunamente disegnati dei *primers* tali da ottenere un amplificato di dimensioni ridotte (fino a 250 bp) (Tabella 4).

La sensibilità e la specificità di *mutation detection* stimate dell'HRM sono rispettivamente del 100% e del 95% (Reed GH et al., 2004).

### 3.2.6 Amplificazione per HRM

Vengono di seguito riportati la mix usata per la PCR pre-melt in un volume totale di 25  $\mu$ l effettuata con il Rotor- Gene e il profilo ciclico di temperatura (Tabella 5 e 6). Per la PCR è stato utilizzato un kit specifico per Real Time (TaKara Ex Taq, TAKARA Bio Inc.). La temperatura di annealing (Ta) è di 60°C per gli SNPs degli esoni 15, 16 e 26a; mentre è di 62°C per gli SNPs degli esoni 11 e 26b (Tabella 6).

Mix di reazione	Quantità x 1 ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	12.95
Buffer 5X Takara	5
MgCl <sub>2</sub> 50 $\mu$ M Takara	1.5
dNTPs 10mM Takara	0.5
pForward 10 $\mu$ M	0.75
pReverse 10 $\mu$ M	0.75
EvaGreen 20X	1.25
Taq Takara	0.3
TOTALE	23 $\mu$ l mix + 2 $\mu$ l DNA

**Tabella 5:** Mix per la PCR pre-melt

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	30"	40
Ta	30"	
72	30"	
72	5'	1

**Tabella 6:** Profilo ciclico di temperatura e tempo per l'amplificazione.

Il protocollo è stato applicato per tutti i campioni dei casi e dei controlli esaminati.

Per ogni esone e in ogni corsa è stato amplificato in triplice copia anche il DNA di soggetti sani di controllo sequenziati, per poter confrontare l'andamento delle curve di melting dei soggetti in analisi con quelle di controlli sani.

### 3.2.7 Analisi mediante HRM

I campioni ottenuti dall'amplificazione dei singoli esoni del gene SCN1A da DNA genomico dei pazienti in analisi, sono stati di seguito sottoposti a denaturazione termica progressiva, con un *degrees* di 0,1°C. Per ogni esone il *range* di temperatura applicato per l'analisi della curva di dissociazione è stato ristretto nell'intorno (di circa 8-12°C) della temperatura di melt caratteristica di ogni singolo amplificato, come riportato in Tabella 7. Sperimentalmente, la messa a punto delle condizioni ottimali è stata eseguita valutando i grafici relativi alla curva di melt ottenuti eseguendo l'analisi su controlli sani.

<b>Esone</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Range HRM (°C)</b>
11	84,3	79-89
15	82,4	76 -88
16	77	72-82
26a	79,7	75-84
26b	77,5	71-84

**Tabella 7:** Temperatura di melt (Tm) caratteristica di ogni esone del gene *SCN1A* e *range* di temperatura applicato per l'analisi della curva di dissociazione.

L'andamento della curva di melt e delle curve dei grafici di HRM dei pazienti è stato confrontato con l'andamento delle curve di controlli sani di riferimento sequenziati.

I campioni in cui è stata valutata una variazione nelle curve sono stati sottoposti a sequenziamento diretto della regione genica in questione. I grafici di melt e HRM, infatti rivelano la presenza di una alterazione di sequenza, ma non forniscono alcuna informazione sulla natura di questa; di conseguenza si rende necessario sequenziare il prodotto di amplificazione.

### 3.2.8 Sequenziamento del gene SCN1A

Sono stati sequenziati gli amplificati di tre soggetti di controllo per ciascun esone. Per l'unico polimorfismo (Esone 16 A3199G) con una frequenza di eterozigotità significativa (0.33) sono stati evidenziati 3 andamenti dell'HRM compatibili con i 3 diversi genotipi (omozigote AA, eterozigote GA, omozigote GG) che sono stati sequenziati per identificazione certa, trovando una perfetta corrispondenza con i risultati dell'HRM. Per gli altri polimorfismi, con una frequenza di eterozigotità molto bassa o non nota, è emerso un unico andamento all'HRM dei 10 soggetti di controllo, pertanto sono stati sequenziati 3 soggetti scelti casualmente tra i controlli sani.

Per sequenziare gli amplificati di PCR è stata usata la metodica del BigDye Terminator 1.1v Cycle Sequencing (Applied Biosystems) ed il sequenziatore automatico Abi Prism 310 (Applied Biosystems).

Il principio dell'analisi di sequenza si basa sull'incorporazione di 2'-3' dideossinucleotidi trifosfati marcati (*dye terminators*) nella catena di DNA in allungamento. La peculiare caratteristica di questi nucleotidi, ovvero l'assenza di gruppi ossidrilici in posizione 2' e in posizione 3', impedisce l'aggiunta di altre unità al filamento in sintesi. Questo fa sì che si formino frammenti di DNA di lunghezze diverse, con all'estremità 3' uno dei quattro *dye terminators* che vengono successivamente separati mediante elettroforesi capillare. Un laser agli ioni di argon eccita i diversi fluorocromi dei dideossinucleotidi terminali e la fluorescenza emessa viene rilevata da un sensore CCD (*charge-coupled device*) che la memorizza sotto forma di segnale digitale. Il software di analisi elabora i dati e costruisce un elettroferogramma in cui sono presenti i diversi picchi di emissione con la relativa sequenza.

I prodotti di PCR, prima di essere usati per il sequenziamento, sono stati purificati mediante Microcon Centrifugal Filter Devices (Millipore) colonnine con membrana di cellulosa, in modo tale da concentrare il campione ed eliminare sali, *primers* ed altre molecole residue provenienti dalla reazione di polimerizzazione. Dopo una prima

centrifugazione con acqua sterile (4000 rpm per 15min), il filtro è stato capovolto e il campione è stato eluito con 20µl e ricentrifugato (4000 rpm per 3min).

Sono stati poi utilizzati 4,4 µl del purificato, 1,6 µl del *primer* da sequenza specifico (Tabella 4) e 4 µl di BigDye v1.1 per ottenere la mix di sequenza da sottoporre a 96°C per 10 sec, 50°C per 5 sec e 60°C per 2 min, per un totale di 25 cicli. Alla fine del processo sono state utilizzate colonnine Centri-sep (Applied Biosystems) per la purificazione dei prodotti di reazione, a cui è seguita la denaturazione di 10µl in formamide a 95°C per 5 min. Dopo averli messi in ghiaccio, i campioni sono stati inseriti nel sequenziatore.



## 4. RISULTATI

---

### 4.1 LO STUDIO CLINICO

#### 4.1.1 Caratteristiche della popolazione generale

La popolazione oggetto dello studio è costituita da 1795 soggetti di età inferiore a 18 anni con diagnosi di cefalea, seguiti presso il Centro Cefalee dell'età evolutiva del Dipartimento di Pediatria di Padova dal 1995 al 2008, la cui documentazione era completa e disponibile. Le caratteristiche di tale popolazione è sintetizzata in Tabella 8.

Soggetti	N=1795	%
Sesso		
-maschi	835	46,5
-femmine	960	
Rapporto M/F	1/1,15	
Emicrania	957	53,3
-ESA	836	
-ECA	121	
Rapporto M/F	1/1,1	
Cefalea tensiva	686	38,2
-CTE	621	
-CTC	65	
Rapporto M/F	1/1,3	
Altri tipi di cefalea	152	8,5
-altre cefalee primarie	132	7,4
-cefalee secondarie	20	1,1
Crisi epilettiche	68	
-casi selezionati *	56	3,1

**Tabella 8:** Caratteristiche dei 1795 soggetti con cefalea.

ESA=emicrania senza aura, ECA=emicrania con aura, CTE=cefalea tensiva episodica, CTC=cefalea tensiva cronica; \*Criteri di inclusione: epilessia idiopatica o criptogenetica o crisi epilettiche isolate.

Tra i 1795 cefalogici, 1775 soggetti hanno una cefalea primaria, che secondo i criteri ICHD-II (2004), corrisponde ad una diagnosi di emicrania in 957 soggetti (53,3%) e di

cefalea tensiva in 686 soggetti (38,2%); gli altri 132 soggetti (7,4%) presentano altre cefalee primarie e tra questi 14 soggetti (0,8%) hanno una cefalea trafittiva idiopatica.

Tra i 957 soggetti emicranici, 836 soggetti (87,3%) presentano ESA (tra questi 136 soggetti hanno ESA e CTE e 4 soggetti hanno ESA e CTC) e 121 soggetti (12,7%) sono affetti da ECA (tra questi 8 soggetti hanno ECA ed ESA e 11 soggetti hanno ECA e CTE). Tra i 686 soggetti (38,2%) con cefalea tensiva, 621 soggetti (90,5%) presentano CTE e 65 soggetti (9,5%) presentano CTC.

Cefalee secondarie sono state diagnosticate solo in 20 soggetti (1,1%) e tra questi 14 casi presentano una cefalea attribuita a disturbo di somatizzazione.

Dei 1795 cefalalgici, 68 soggetti avevano un storia personale di crisi epilettiche, tra i quali 56 soggetti rispettavano i criteri di inclusione del presente studio e presentavano, quindi, comorbidità tra cefalea primaria ed epilessia idiopatica o criptogenetica.

Pertanto la prevalenza di epilessia idiopatica o criptogenetica nella popolazione dei cefalalgici risulta pari a 3,1% (N=56/1795).

#### **4.1.2 Soggetti con comorbidità**

Tra i 56 soggetti che presentano comorbidità vi sono 20 maschi (35,7%) e 36 femmine (64,3%) con un rapporto maschi a femmine di 1 a 1,8. L'età media all'esordio della cefalea è 8,6 anni (range 3-17 anni, DS 4,3 anni), mentre l'età media all'esordio dell'epilessia è 7,8 anni (range 1-24 anni, DS 4 anni). In 25 soggetti (44%) l'esordio dell'epilessia ha preceduto quello della cefalea, in 16 soggetti (28,6%) l'esordio della cefalea è avvenuto nello stesso anno dell'epilessia e nei restanti 15 casi (27,4%) l'esordio della cefalea ha preceduto quello dell'epilessia.

## La cefalea

La prevalenza dei diversi tipi di cefalea nella popolazione dei 56 soggetti con comorbidità è così ripartita:

- ESA: 55,4% (N=31)
- ESA + CTE: 12,5 % (N=7)
- ESA + CTC: 1,8 % (N=1)
- ECA: 7,1 % (N=4)
- ECA + ESA: 5,4 % (N=3)
- CTE: 17,9 % (N=10)

Complessivamente 46 soggetti (82,1%) sono affetti da emicrania, con una diagnosi di secondo livello di ESA nel 69,6% (N=39) e di ECA nel 12,5% (N=7) dei casi mentre 10 soggetti (17,9%) presentano solo cefalea tensiva, con una diagnosi di secondo livello di CTE nel 100% dei casi; non sono presenti altri tipi di cefalea indipendenti dalle crisi epilettiche.

Nella popolazione 1795 soggetti cefalalgici, confrontando la distribuzione del tipo di cefalea nei casi rispettivamente con e senza epilessia, la prevalenza di emicrania nei soggetti con epilessia (82,1%, N=46/56) è significativamente maggiore rispetto ai casi senza epilessia (52%, N=911/1739). La netta maggiore prevalenza di emicrania rispetto ad altri tipi di cefalea nei soggetti con epilessia risulta statisticamente significativa ( $p = 0.014$ ).

Nei soggetti con comorbidità (N=56), il rischio di emicrania è risultato 4,5 volte più elevato rispetto al rischio di cefalea tensiva, senza una significativa differenza tra ESA ed ECA (rispettivamente 4,6 e 5,0;  $p=0.89$ ). Il rapporto di ECA ed ESA è di 1 a 5,6 (N=7/39).

In circa un terzo dei casi con comorbidità (34%, N=19/56) è stata diagnosticata la cefalea post-critica secondo i criteri ICHD-II (7.6.2) (2004). La maggior parte dei soggetti con cefalea post-critica (84%, N=16/19) presentava attacchi di emicrania indipendenti dalle crisi epilettiche; tuttavia nei soggetti con emicrania non è stato riscontrato un maggior rischio di cefalea post-critica rispetto ai soggetti con cefalea

tensiva ( $p=0.58$ ). Pertanto la maggiore prevalenza di cefalea post-critica nei soggetti con emicrania ed epilessia sembra dipendere alla maggiore prevalenza di emicrania in tale popolazione. La cefalea post-critica era prevalente nei soggetti con epilessia temporo-occipitale criptogenetica ( $N=11/18$ , 61%) rispetto agli altri tipi di epilessia (epilessia frontale criptogenetica  $N=3/9$ , 33%; epilessie parziali idiopatiche  $N=3/11$ , 27%; epilessie generalizzate idiopatiche  $N=2/10$ , 20%).

Dei 7 soggetti con ECA nessuno ha presentato episodi di *migraines*. Tra i 56 casi con comorbidità nessuno ha manifestato episodi di cefalea ictale epilettica.

### L'epilessia

Tra i 56 soggetti con comorbidità, 3 casi (5,3%) hanno presentato finora crisi epilettiche isolate, mentre 53 soggetti sono affetti da un'epilessia con attacchi ricorrenti. Valutando la distribuzione dell'epilessia nella popolazione dei cefalalgici ( $N=1795$ ) in base al tipo di cefalea (emicrania vs cefalea tensiva) è risultato che la prevalenza dell'epilessia negli emicranici risulta significativamente maggiore rispetto ai soggetti con cefalea tensiva; infatti l'epilessia è presente nel 4,8% ( $N=46/957$ ) degli emicranici e nell'1,5% ( $N=10/686$ ) dei soggetti con cefalea tensiva pura ( $p=0.0001$ ). Il rischio di epilessia (odds ratio) negli emicranici è risultato 3,2 volte più elevato rispetto ai soggetti con cefalea tensiva (IC al 95%=1,7-6,2). L'epilessia è presente nel 5,4% dei soggetti con ESA e nel 5,8% dei casi con ECA, senza una differenza statisticamente significativa tra i due tipi di emicrania che si possono associare ad epilessia.

Nei soggetti con comorbidità, il tipo di epilessia (focale vs generalizzata) più frequente è l'epilessia focale (76,8%,  $N=43/56$ ); considerando l'eziologia (idiopatica vs criptogenetica), prevalgono le epilessie criptogenetiche (57,1%). In Tabella 9 è riportata la distribuzione delle epilessie (per tipo ed eziologia) nei soggetti con comorbidità, suddivisi in base al tipo di cefalea.

E' stata valutata la distribuzione del tipo epilessia (focale vs generalizzata) rispetto al tipo di cefalea (emicrania vs cefalea tensiva) ed è risultato che tale distribuzione non differisce significativamente tra emicrania e cefalea tensiva ( $p=0.77$ ). Infatti nei soggetti

con epilessia focale, l'emicrania e la cefalea tensiva sono presenti rispettivamente nel 78,3% e nel 70% dei casi (Tabella 9).

<b>Epilessia</b>	<b>Totale N=56 (%)</b>	<b>Emicrania N=46 (%)</b>	<b>Cefalea tensiva N=10 (%)</b>
Focale	43 (76,8)	36 (78,3)	7 (70)
Generalizzata	10 (17,9)	8 (17,4)	2 (20)
Crisi isolata	3 (5,3)	2 (4,3)	1 (10)
Criptogenetica	32 (57,1)	27 (58,7)	5 (50)
Idiopatica	21 (37,6)	17 (37)	4 (40)
Crisi isolata	3 (5,3)	2 (4,3)	1 (10)
Focale criptogenetica	32 (57,1)	27 (58,7)	5 (50)
Focale idiopatica	11 (19,7)	9 (19,6)	2 (20)
Generalizzata idiopatica	10 (17,9)	8 (17,4)	2 (20)
Crisi epilettiche isolate	3 (5,3)	2 (4,3)	1 (10)

**Tabella 9:** Distribuzione dell'epilessia in base al tipo di cefalea nei soggetti con comorbidità.

E' stata, inoltre, valutata la distribuzione del tipo di epilessia (focale e generalizzata) rispetto al tipo di emicrania (ESA vs ECA): tale distribuzione risulta sovrapponibile nei due gruppi di emicranici e non vi sono differenze statisticamente significative ( $p=0.9$ ). Infatti l'epilessia è focale nell'81,6% dei soggetti con ESA e nell'83% dei soggetti con ECA mentre è generalizzata nel 18,4% dei soggetti con ESA e nel 17% dei soggetti con ECA.

Anche la distribuzione dell'epilessia in base all'eziologia (idiopatica vs criptogenetica) non differisce significativamente nei soggetti con emicrania rispetto ai soggetti con cefalea tensiva (Tabella 9).

Tra i soggetti emicranici con epilessia focale ( $N=36$ ), prevalgono nettamente le forme criptogenetiche ( $N=27/36$ , 75%) rispetto a quelle idiopatiche ( $N=9/36$ , 25%) e la probabilità che un soggetto emicranico con epilessia focale presenti un'epilessia criptogenetica è 3 volte maggiore rispetto ad una forma idiopatica ( $p = 0.003$ ).

Tra i soggetti con emicrania ed epilessia focale ( $N=36$ ), 27 soggetti sono affetti da un'epilessia focale criptogenetica; in 22 su 27 casi è stato possibile determinare il lobo

cerebrale di origine (frontale, parietale, temporale, occipitale) (Tabella 10). Nei soggetti con emicrania ed epilessia focale criptogenetica a sede nota (N=27), prevalgono le epilessie temporo-occipitali (N=16) rispetto a quelle frontali (N=6) (p=0.06).

Epilessia	Totale N	Emicrania N (%)	Cefalea tensiva N (%)
Epilessia focale idiopatica	11	9/11 (82%)	2/11 (18%)
- rolandica	9	7/9 (78%)	2/9 (22%)
- occipitale	2	2/2 (100%)	0
Epilessia focale criptogenetica	32	27/32 (84%)	5/32 (16%)
- frontale	9	6/9 (67%)	3/9 (33%)
- temporo-occipitale	18	16/18 (89%)	2/18 (11%)
- sede non nota	5	5	0
Epilessia generalizzata idiopatica	10	8/10 (80%)	2/10 (20%)
Crisi epilettiche isolate	3	2/3 (67%)	1/3 (33%)

**Tabella 10:** Frequenza di emicrania e cefalea tensiva in base al tipo di epilessia nei soggetti con comorbidità.

Il 17,8% (N=10/56) dei casi con comorbidità aveva una storia di convulsioni febbrili.

Sono stati rivisti i tracciati EEG dei 56 soggetti con comorbidità per valutare la presenza di fotosensibilità. In 7 casi (12,5%) è stata riscontrata una risposta fotoparossistica; tra questi 2 soggetti presentavano anche una risposta fotoconvulsiva. La risposta fotoparossistica era caratterizzata dalla presenza di scariche generalizzate di punte o punte-onda nella maggior parte dei casi (N=6/7, 85,7%), e solo un soggetto presentava scariche bilaterali sulle regioni occipitali all'EEG durante stimolazione luminosa intermittente.

### Le sindromi periodiche

Tra i 56 soggetti che presentano comorbidità è stata indagata l'anamnesi personale del probando e la familiarità per sindrome periodica. Sono stati individuati 4 soggetti con storia personale di sindrome periodica, secondo gli attuali criteri di classificazione (ICHHD-II, 2004). Due soggetti presentano storia personale di emicrania addominale e uno di questi presenta anche storia personale e familiare di vomito ciclico; altri due soggetti hanno una storia personale di vertigine parossistica benigna (VPB). Tutti i 4 soggetti sono affetti da emicrania senza aura e nel 75% dei casi l'epilessia è di tipo focale criptogenetica; un soggetto con VPB ha un'epilessia generalizzata idiopatica (epilessia con assenze dell'infanzia). Pertanto la prevalenza complessiva di sindromi periodiche nei soggetti con emicrania ed epilessia è dell'8,6% (4/46). L'emicrania addominale e la vertigine parossistica benigna sono presenti nel 4,3% (2/46) dei casi, e il vomito ciclico nel 2,1% (1/46) degli emicranici con epilessia. La familiarità per sindrome periodica è stata riscontrata in un solo soggetto e si trattava, come nel probando, di vomito ciclico.

### La familiarità

E' stata valutata la presenza di familiarità per cefalea o epilessia nel gruppo dei 56 probandi con comorbidità, considerando il numero di probandi con storia familiare positiva. La familiarità era negativa per entrambi i disturbi nel 12,8% dei casi, positiva solo per epilessia nell'8,5% dei casi, positiva solo per cefalea nel 40,4% dei casi e positiva sia per epilessia che per cefalea nel 38,3% dei casi.

Complessivamente il 39% (N=22/56) dei probandi presentava una familiarità positiva per epilessia idiopatica o criptogenetica, con almeno un parente di primo grado affetto nel 12,5% (N=7/56) dei casi.

La familiarità per cefalea nei parenti è stata valutata determinando la percentuale di probandi con familiarità positiva per i vari tipi di cefalea, distinguendoli in base al grado di parentela e all'appartenenza alla linea materna e paterna (Tabella 11).

<b>Cefalea dei familiari</b>	<b>Probandi con familiarità N (%)</b>	<b>Familiarità I grado N (%)</b>	<b>Familiarità I grado LM N (%)</b>	<b>Familiarità I grado LP N (%)</b>
Cefalea	41/56 (73,2)	35/56 (62,5)	25/56 (44,6)	12/56 (21,4)
Emicrania	37/56 (66,1)	30/56 (53,6)	23/56 (41,1)	8/56 (14,3)
-ESA	32/56 (57,1)	27/56 (48,2)	20/56 (35,7)	8/56 (14,3)
-ECA	5/56 (8,9)	3/56 (5,4)	3/56 (5,4)	0/56 (0)

**Tabella 11:** Familiarità per cefalea ed emicrania nei 56 probandi con comorbidità (LM: linea materna; LP: linea paterna).

La familiarità per cefalea nei probandi è risultata elevata (73,2%, N=41/56) e prevale l'emicrania (90%, N=37/41) rispetto ad altri tipi di cefalea, infatti il 66,1% (N=37/56) dei probandi ha una familiarità per emicrania. Nei probandi con familiarità per emicrania, essa è presente nei parenti di primo grado nella maggior parte dei casi (81%, N=30/37), e prevale in linea materna (77%, N=23/30) rispetto alla linea paterna (27%, N=8/30). La familiarità per ECA (5,4%, N=3/56) è presente esclusivamente in linea materna nei parenti di I grado (Tabella 11).

Sono state ricercate possibili correlazioni tra la familiarità per emicrania ed il tipo di cefalea e di epilessia del probando, ma non sono emerse differenze statisticamente significative.

La familiarità per emicrania è presente nel 67% (N = 31/46) dei probandi emicranici e nel 60% (N = 6/10) dei probandi con cefalea tensiva (Tabella 12). Valutando la frequenza di familiarità per emicrania o epilessia rispetto al tipo di emicrania del probando (ESA vs ECA) non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi di probandi emicranici; infatti la familiarità per emicrania presenta prevalenze sovrapponibili nei soggetti con ESA (67%) rispetto a quelli con ECA (71%) (Tabella 12). Così pure la familiarità per epilessia si distribuisce in modo uniforme nei due gruppi di probandi emicranici (ESA vs ECA), risultando positiva nel 61% dei soggetti con ESA e nel 57% di quelli con ECA (Tabella 12).



<b>Cefalea del probando</b>	<b>Familiarità per cefalea N (%)</b>	<b>Familiarità per emicrania</b>	<b>Familiarità per epilessia N (%)</b>
Cefalea totale	41/56 (73%)	37/56 (66%)	22/56 (39%)
Emicrania	37/46 (80%)	31/46 (67%)	18/46 (39%)
-ESA	32/39 (82%)	26/39 (67%)	15/39 (38%)
-ECA	5/7(71%)	5/7 (71%)	3/7 (43%)
Cefalea tensiva	4/10 (40%)	6/10 (60%)	4/10 (40%)

**Tabella 12:** Familiarità per cefalea, emicrania ed epilessia nei soggetti con comorbidità distinta in base al tipo di cefalea del probando.

La familiarità positiva per epilessia idiopatica o criptogenetica è stata riscontrata nel 39% (N=22/56) dei probandi e il 12,5% (N=7/56) dei probandi presentava almeno un parente di primo grado affetto da epilessia idiopatica o criptogenetica .

La familiarità positiva per epilessia non è risultata correlata, in modo statisticamente significativo, al tipo di cefalea o di epilessia del probando ( $p>0.05$ ).

## 4.2 LO STUDIO GENETICO

### 4.2.1 Analisi del gene SCN1A mediante HRM

Il *software* di analisi delle curve di dissociazione estrapola tre principali tipi di grafici per l'analisi dei risultati: un grafico delle temperature di melt e due grafici specifici dell'HRM il *normalized graph* e il *difference graph* (Figure 4-6). Il *normalized graph* è il grafico delle temperature di melting normalizzate rispetto alla curva di melting di riferimento dei controlli (Figura 5), mentre il *difference graph* consiste nella visualizzazione dei valori di temperatura di melting sottratti a quelli identificati per la classe di omozigoti o per la quella di eterozigoti (Figura 6).

Inizialmente è stato valutato il profilo dell'HRM dei 5 polimorfismi selezionati in 10 controlli sani di riferimento, alcuni dei quali sono stati sequenziati per identificazione certa, trovando una perfetta corrispondenza con i risultati dell'HRM.

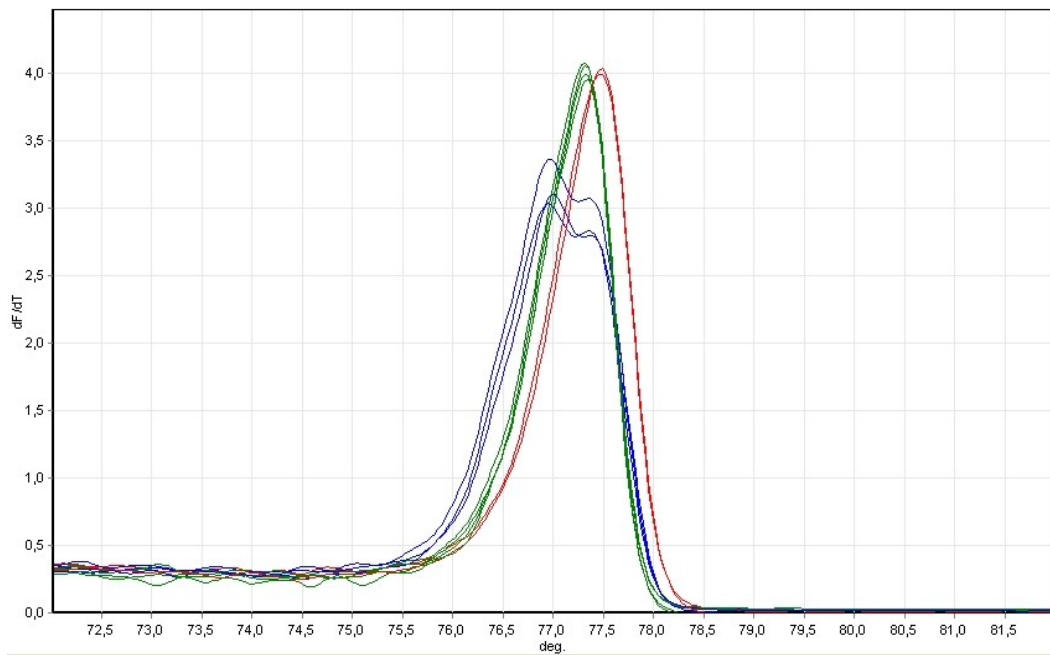
E' stata effettuata l'analisi mediante HRM dei 5 polimorfismi sui campioni dei 49 pazienti selezionati e dei 100 controlli sani non emicranici.

Il confronto dell'andamento delle curve dei tre grafici (grafico delle temperature di melt, il *normalized graph* e il *difference graph*) dei campioni esaminati rispetto a quello dei controlli di riferimento sequenziati ha permesso di identificare il genotipo dei soggetti analizzati.

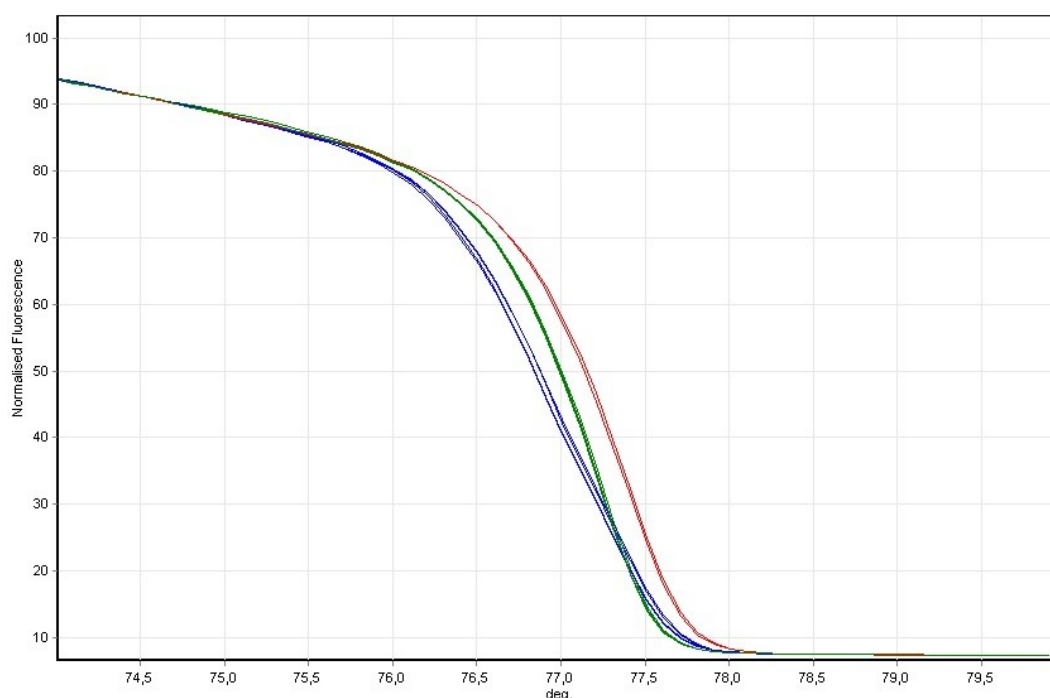
Per il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 con una eterozigosità significativa (0.33) sono stati evidenziati, nel grafico delle curve di melt dei controlli e dei pazienti, tre andamenti compatibili con i tre diversi genotipi (omozigote AA, eterozigote GA, omozigote GG) (Figure 4-6).

Per tutti gli altri polimorfismi, che hanno una eterozigosità molto bassa o non nota, è emerso, sia pazienti che nei controlli sani non emicranici, un unico andamento compatibile con il genotipo *wild type* (Figure 7-9).

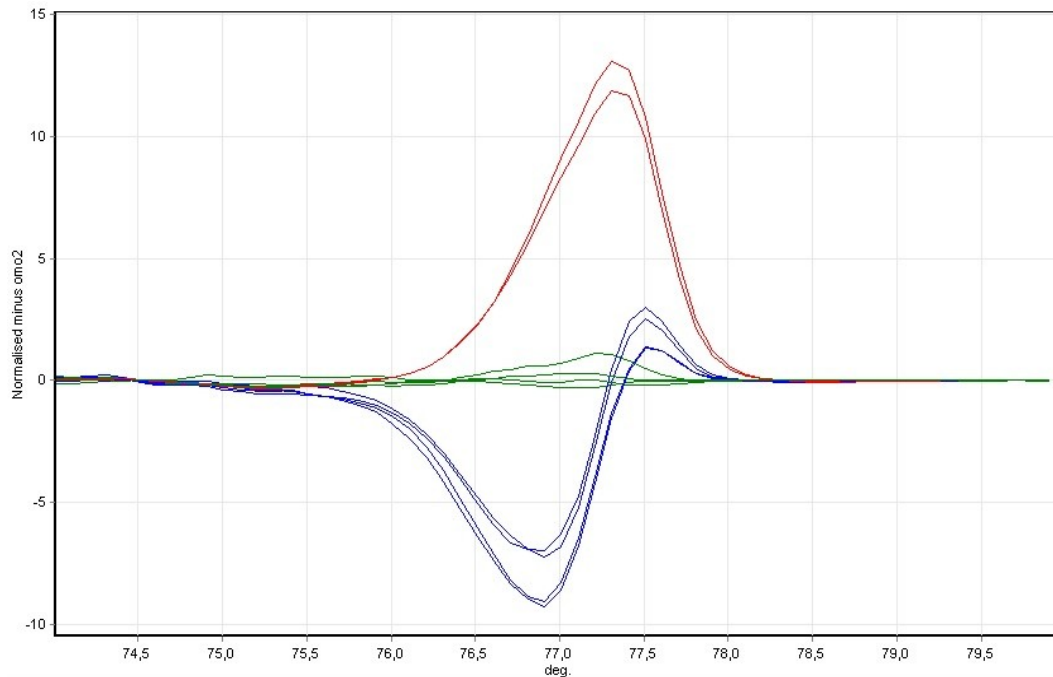
A titolo esemplificativo sono riportate le curve di melt dell'analisi HRM dei polimorfismi rispettivamente dell'esone 16 (Figure 4-6) e dell'esone 11 (Figure 7-9).



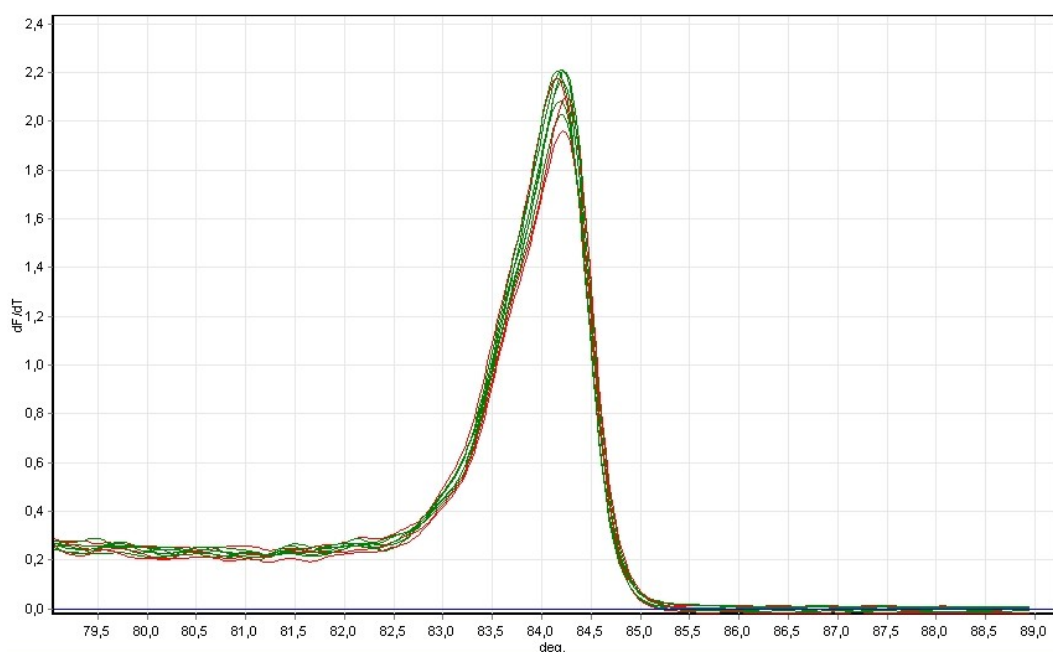
**Figura 4:** Grafico delle temperature di melt ( $T_m$ ) della regione amplificata per il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 del gene SCN1A mediante HRM. In verde è evidenziato l'omozigote A/A, in blu l'eterozigote A/G, in rosso l'omozigote G/G).



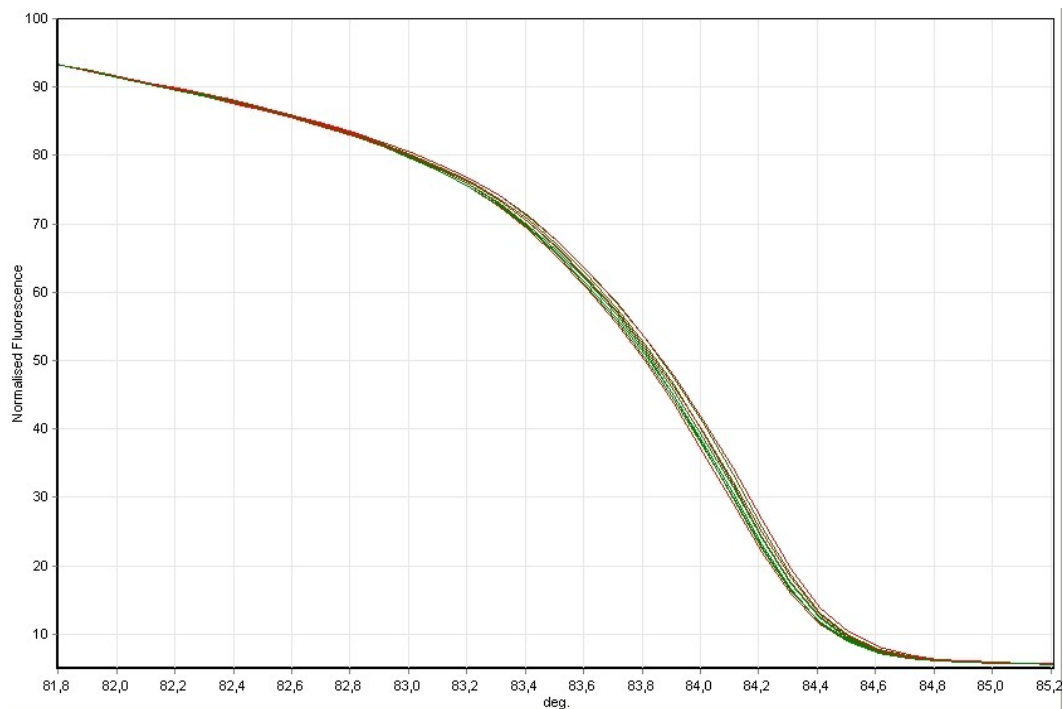
**Figura 5:** Grafico delle  $T_m$  normalizzate (*normalized graph*) della regione amplificata per il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 del gene SCN1A mediante HRM. In verde è evidenziato l'omozigote A/A, in blu l'eterozigote A/G, in rosso l'omozigote G/G).



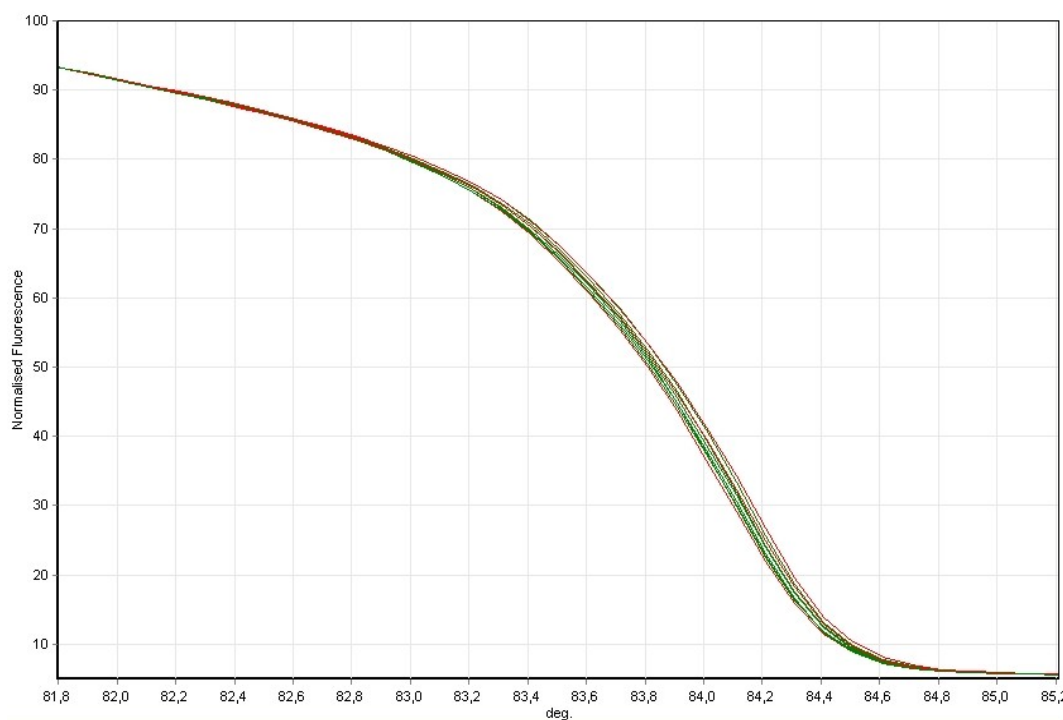
**Figura 6:** *Difference graph* della regione amplificata per il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 del gene SCN1A mediante HRM. In verde è evidenziato l'omozigote A/A, in blu l'eterozigote A/G, in rosso l'omozigote G/G).



**Figura 7:** Grafico delle temperature di melt ( $T_m$ ) della regione amplificata per il polimorfismo c.1748A>T dell'esone 11 del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote A/A), in verde i campioni esaminati.



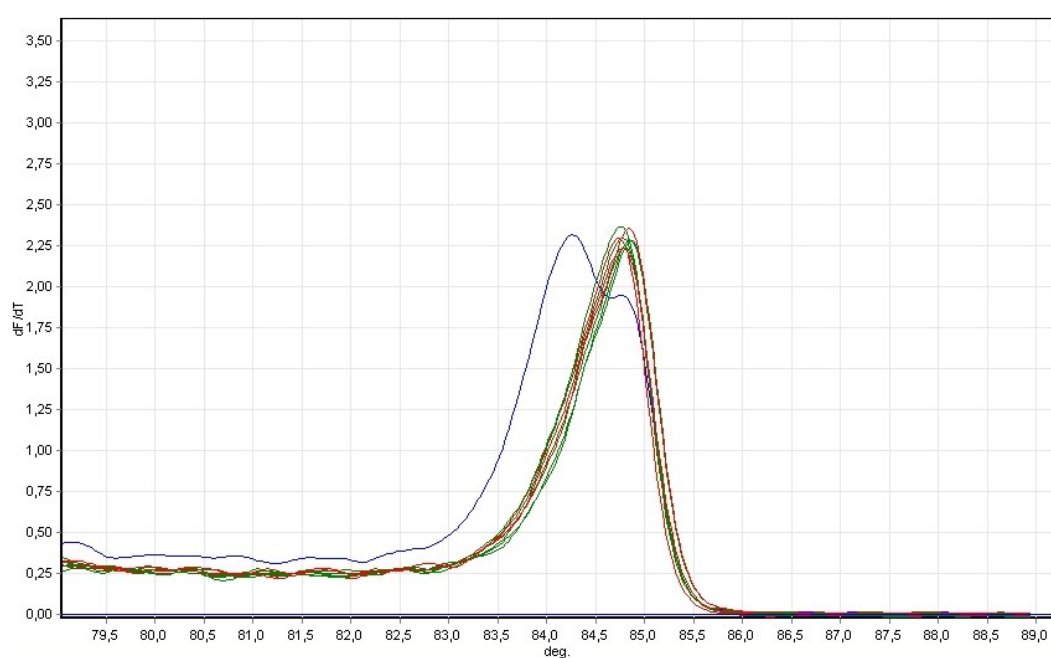
**Figura 8:** Grafico delle Tm normalizzate (*normalized graph*) della regione amplificata per il polimorfismo c.1748A>T dell'esone 11 del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote A/A), in verde i campioni esaminati.



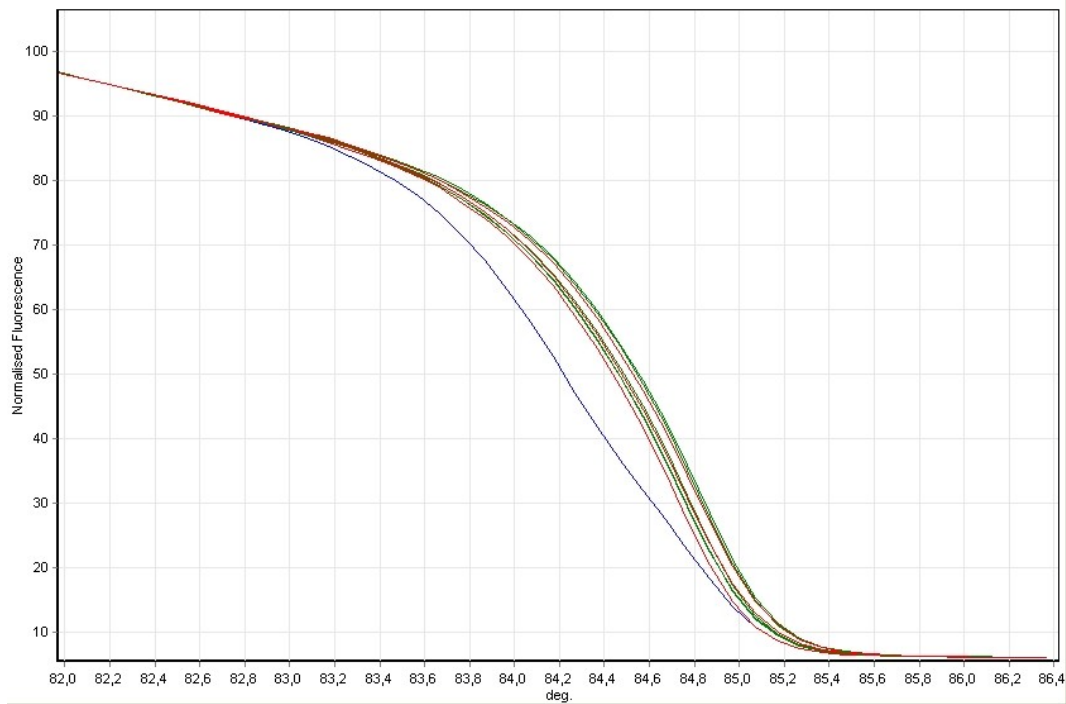
**Figura 9:** *Difference graph* della regione amplificata per il polimorfismo c.1748A>T dell'esone 11 del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote A/A), in verde i campioni esaminati.

#### 4.2.2 Andamenti anomali dell'HRM

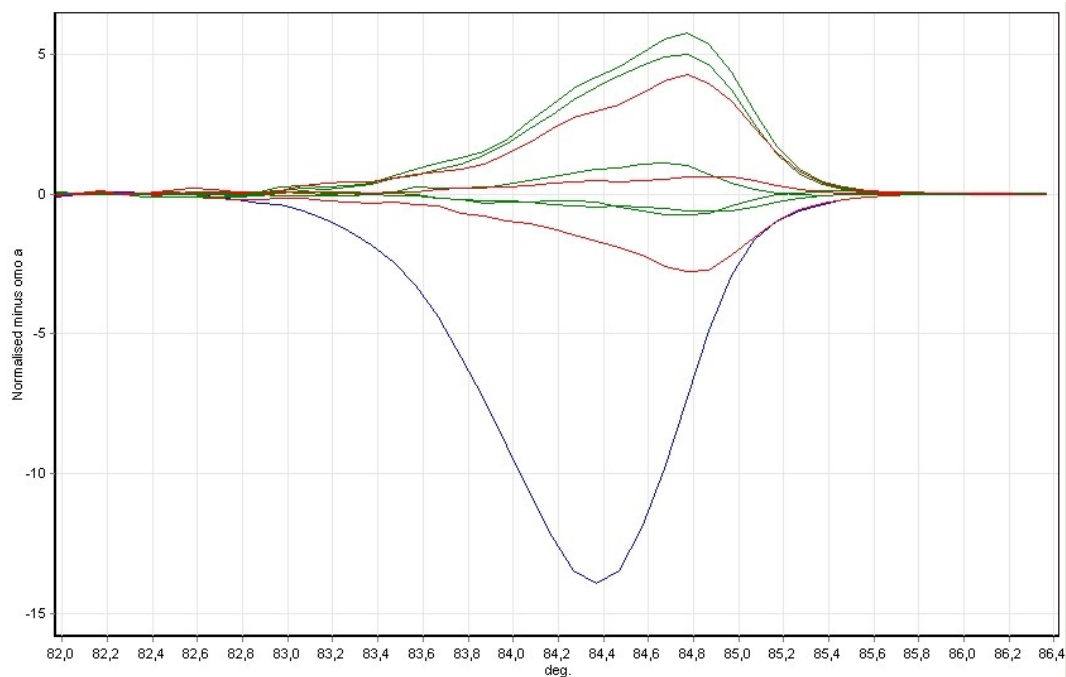
Durante l'analisi HRM è emerso che in due dei casi esaminati le curve di melt presentavano degli andamenti anomali e non sovrapponibili alle curve corrispondenti ai genotipi noti. Questo si è verificato, nell'analisi dei pazienti, per il campione corrispondente all'esone 11 del paziente 7 (Figure 10-12) e nell'analisi dei controlli sani non emicranici per il campione corrispondente all'esone 26a del soggetto identificato come C49 (Figure 13-15). In entrambi i casi è stato effettuato il sequenziamento diretto. Vengono di seguito riportate le curve di melt corrispondenti che evidenziano gli andamenti anomali rispetto alle curve dei campioni con genotipo noto.



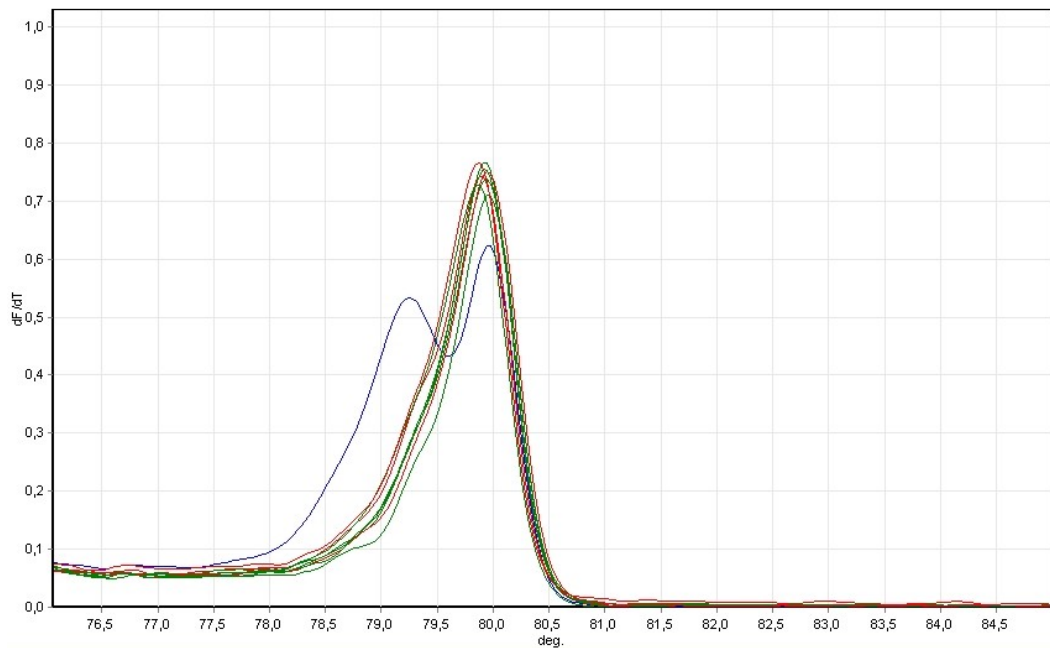
**Figura 10:** Grafico delle temperature di melt ( $T_m$ ) della regione amplificata per il polimorfismo c.1748A>T dell'esone 11 del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote A/A), in verde i campioni esaminati, in blu il paziente 7 che mostra un andamento diverso della curva rispetto all'omozigote A/A.



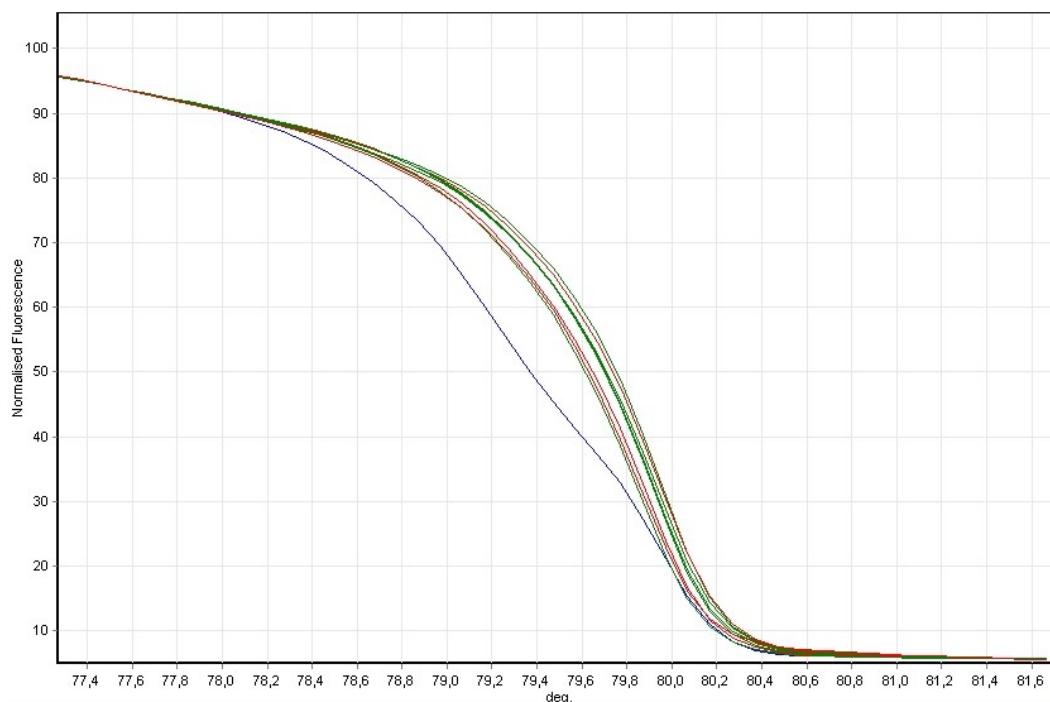
**Figura 11:** Grafico delle Tm normalizzate (*normalized graph*) della regione amplificata per il polimorfismo c.1748A>T dell'esone 11 del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote A/A), in verde i campioni esaminati, in blu il paziente 7 che mostra un andamento diverso della curva rispetto all'omozigote A/A.



**Figura 12:** Difference graph della regione amplificata per il polimorfismo c.1748A>T dell'esone 11 del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote A/A), in verde i campioni esaminati, in blu il paziente 7 che mostra un andamento diverso della curva rispetto all'omozigote A/A.

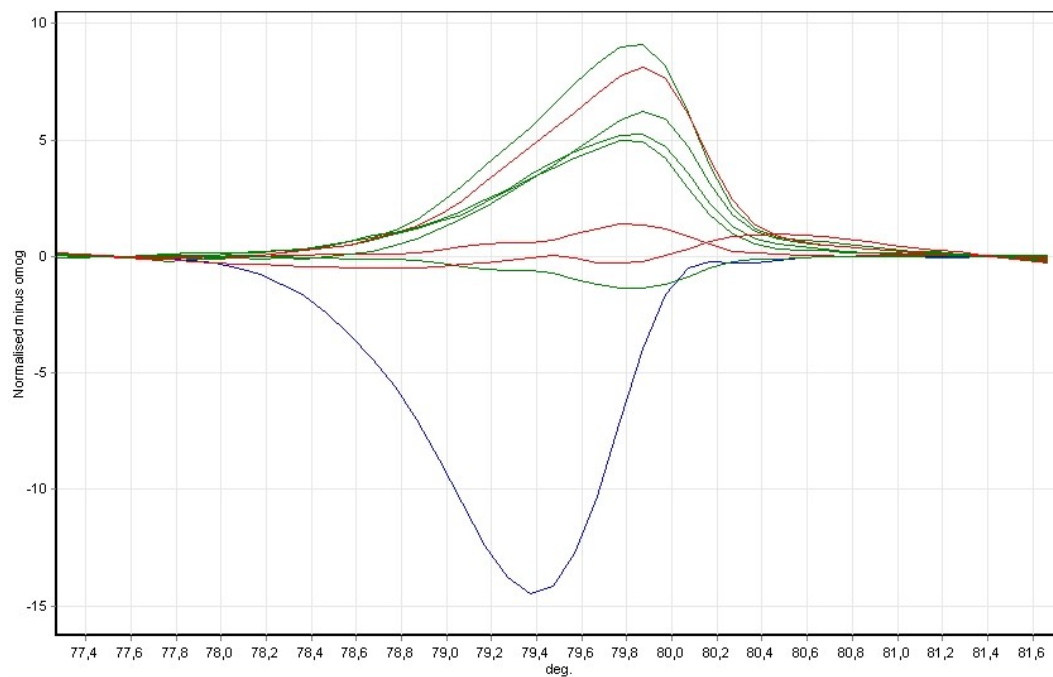


**Figura 13:** Grafico delle temperature di melt ( $T_m$ ) della regione amplificata per il polimorfismo c.5771G>A dell'esone 26a del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote G/G), in verde i campioni esaminati, in blu il controllo sano non emicranico C49 che mostra un andamento diverso della curva rispetto all'omozigote G/G.



**Figura 14:** Grafico delle  $T_m$  normalizzate (*normalized graph*) della regione amplificata per il polimorfismo c.5771G>A dell'esone 26a del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote G/G), in verde i campioni esaminati, in blu il controllo sano non emicranico C49 che mostra un andamento diverso della curva rispetto all'omozigote G/G.





**Figura 15:** Difference graph della regione amplificata per il polimorfismo c.5771G>A dell'esone 26a del gene SCN1A mediante HRM. In rosso sono evidenziati i controlli di riferimento sequenziati (omozigote G/G), in verde i campioni esaminati, in blu il controllo sano non emicranico C49 che mostra un andamento diverso della curva rispetto all'omozigote G/G.

### 4.2.3 Sequenziamento del gene SCN1A

#### Controlli di riferimento

Inizialmente è stato valutato il profilo dell'HRM dei 5 polimorfismi selezionati in 10 controlli sani di riferimento, alcuni dei quali sono stati sequenziati per identificazione certa, trovando una perfetta corrispondenza con i risultati dell'HRM. In particolare nel caso del polimorfismo c.3199A>G l'esone 16 sono stati sequenziati due campioni per ognuna delle tre curve prodotte confermando che ogni curva corrisponde ad un diverso genotipo (Figure 4-6). Come evidenziato in tali figure i tre diversi genotipi (omozigote A/A, eterozigote A/G, omozigote G/G) sono caratterizzati da curve di melt ben distinte, che consentono una precisa identificazione del genotipo di ogni campione esaminato.

#### Andamenti anomali

Gli amplificati degli esoni che presentavano andamenti anomali sono stati sequenziati in entrambi i sensi di lettura (*forward e reverse*).

Mediante l'analisi degli elettroferogrammi delle sequenze ed il loro allineamento in BLAST sono state riscontrate due variazioni di sequenza, di tipo missenso, in due soggetti, di cui una a carico dell'esone 11 in un paziente (identificato come paziente 7) ed una a carico dell'esone 26 di un controllo sano non emicranico (identificato come C49). In Figura 16 sono riportati gli elettroferogrammi relativi, in cui sono evidenziate le alterazioni di sequenza riscontrate.

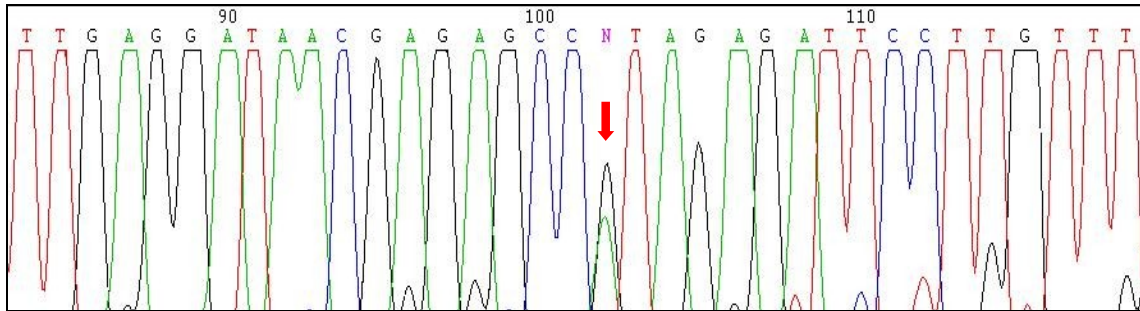
Nel paziente 7 è stata riscontrata una variante missenso c.1811G>A a carico dell'esone 11 (Figura 16A) che produce a livello della proteina la sostituzione di una Arginina con una Istidina (p.604R>H).

Il paziente 7 è un soggetto di 15 anni con pregressa epilessia con assenze dell'infanzia (comparsa all'età di 3 anni e risolta a 6 anni) e affetto da cefalea tensiva episodica, esordita all'età di 11 anni. La storia familiare è caratterizzata da epilessia comparsa in età infantile ma non meglio specificata in un cugino di II grado e da cinetosi nella madre. La storia personale è negativa per convulsioni febbrili o sindromi periodiche.

La variante missenso c.5782C>G all'interno dell'esone 26 (Figura 16B) riscontrata in un unico controllo sano non emicranico (identificato come C49) determina la sostituzione di una Arginina con una Glicina (p.1928R>G).

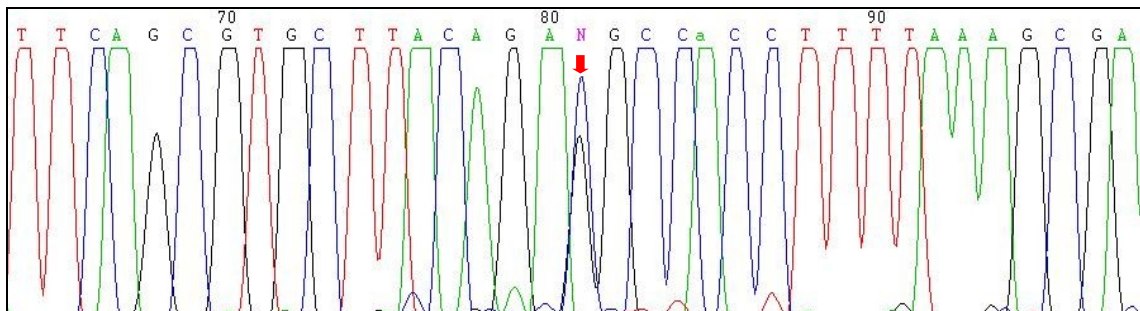
**c.[1811G>A] (ex11) p.[604R>H]**

**A**



**c.[5782C>G] (ex26a) p.[1928R>G]**

**B**



**Figura 16 (A e B):** Elettroferogrammi relativi al sequenziamento dei frammenti di PCR rispettivamente dell'esone 11 del paziente 7 (Fig. A) e dell'esone 26a del controllo sano non emicranico (C49) (Fig. B). Nel primo caso la mutazione osservata è la transizione G>A (freccia rossa Fig. A), nel secondo caso la variazione di sequenza osservata è la trazione C>G (freccia rossa Fig. B).

#### 4.2.4 Analisi dei risultati ottenuti

Vengono di seguito riportate le frequenze alleliche e genotipiche, rispettivamente assolute (Tabella 13 e 14) e percentuali (Tabella 15 e 16), dei 5 SNPs osservate nei 49 pazienti e nei 100 controlli sani non emicranici, esaminati mediante HRM.

<b>POLIMORFISMI SCN1A</b>					
<b>PAZIENTI (N=49)</b>	<b>Esone 11 c. 1748A&gt;T</b>	<b>Esone 15 c.2656T&gt;C</b>	<b>Esone 16 c.3199A&gt;G</b>	<b>Esone 26a c.5771G&gt;A</b>	<b>Esone 26b c.5864T&gt;C</b>
ALLELI	A	T	A	G	T
	98	98	65	98	98
	T	C	G	A	C
	0	0	33	0	0
GENOTIPI	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T
	49	49	22	49	49
	A/T	T/C	A/G	G/A	T/C
	0	0	21	0	0
	T/T	C/C	G/G	A/A	C/C
	0	0	6	0	0

**Tabella 13:** Frequenze assolute degli alleli e dei genotipi osservate nei pazienti.

<b>POLIMORFISMI SCN1A</b>					
<b>CONTROLLI (N=100)</b>	<b>Esone 11 c. 1748A&gt;T</b>	<b>Esone 15 c.2656T&gt;C</b>	<b>Esone 16 c.3199A&gt;G</b>	<b>Esone 26a c.5771G&gt;A</b>	<b>Esone 26b c.5864T&gt;C</b>
ALLELI	A	T	A	G	T
	200	200	123	200	200
	T	C	G	A	C
	0	0	77	0	0
GENOTIPI	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T
	100	100	42	100	100
	A/T	T/C	A/G	G/A	T/C
	0	0	39	0	0
	T/T	C/C	G/G	A/A	C/C
	0	0	19	0	0

**Tabella 14:** Frequenze assolute degli alleli e dei genotipi osservate nei controlli sani non emicranici.

	POLIMORFISMI SCN1A				
PAZIENTI (N=49)	Esone 11 c. 1748A>T	Esone 15 c.2656T>C	Esone 16 c.3199A>G	Esone 26a c.5771G>A	Esone 26b c.5864T>C
FREQUENZE ALLELICHE	A	T	A	G	T
	100%	100%	66,3%	100%	100%
	T	C	G	A	C
	0%	0%	33,7%	0%	0%
FREQUENZE GENOTIPICHE	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T
	100%	100%	44%	100%	100%
	A/T	T/C	A/G	G/A	T/C
	0%	0%	44,7%	0%	0%
	T/T	C/C	G/G	A/A	C/C
	0%	0%	11,3%	0%	0%

**Tabella 15:** Frequenze percentuali alleliche e genotipiche osservate nei pazienti.

	POLIMORFISMI SCN1A				
CONTROLLI (N=100)	Esone 11 c. 1748A>T	Esone 15 c.2656T>C	Esone 16 c.3199A>G	Esone 26a c.5771G>A	Esone 26b c.5864T>C
FREQUENZE ALLELICHE	A	T	A	G	T
	100%	100%	61,5%	100%	100%
	T	C	G	A	C
	0%	0%	38,5%	0%	0%
FREQUENZE GENOTIPICHE	A/A	T/T	A/A	G/G	T/T
	100%	100%	37,8%	100%	100%
	A/T	T/C	A/G	G/A	T/C
	0%	0%	47,4%	0%	0%
	T/T	C/C	G/G	A/A	C/C
	0%	0%	14,8%	0%	0%

**Tabella 16:** Frequenze percentuali alleliche e genotipiche osservate nei controlli sani non emcranici.

Dall'analisi della distribuzione di tali frequenze è emerso che solo per il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 sono rappresentati, sia nei casi che nei controlli, entrambi gli alleli, l'allele A *wild type* e l'allele G mutato; mentre per tutti gli altri SNPs la frequenza allelica del *wild type* pari al 100% sia nei casi che nei controlli, valutata

complessivamente su 298 alleli, dimostra che tali SNPs non sono in realtà dei polimorfismi.

Nel caso del polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16, le distribuzioni genotipiche per i due alleli (A e G) sono risultate in equilibrio secondo la legge di Hardy-Weinberg sia nella popolazione dei casi ( $p = 0.64$ ) che in quella dei controlli ( $p = 0.44$ ) (con il test del chi quadro l'equilibrio è presente se  $p > 0.05$ ).

Per tale polimorfismo, il confronto della distribuzione delle frequenze alleliche (A, G) e genotipiche (A/A, A/G, G/G) nei casi e nei controlli con il test del Chi Quadrato non è risultato statisticamente significativo (rispettivamente  $p = 0.49$ ,  $p = 0.58$ ).

## 5. DISCUSSIONE

---

### 5.1 LO STUDIO CLINICO

Per quanto riguarda l'età adulta, la prevalenza di emicrania in soggetti con epilessia è risultata compresa tra l'8 e il 24% (Andermann E et al., 1987; Hauser WA et al., 1991; Ottman R et al., 1994 e 1996; Haut SR et al., 2006) ed il rischio di emicrania era 2,4 volte maggiore tra gli adulti con epilessia rispetto ai soggetti normali (Haut SR et al., 2006; Ottman R et al., 1994 e 1996).

In età evolutiva, la prevalenza di emicrania è risultata significativamente maggiore nei soggetti affetti da epilessia rispetto ai fratelli non epilettici (46% vs 2,5%) (Yamane LE et al., 2004). Nei bambini con epilessia parziale l'emicrania era presente nel 21% dei casi con epilessia rolandica benigna e nel 17% dei casi con epilessia criptogenetica o sintomatica (Wirrell EC et al., 2006).

Gli studi condotti negli ultimi 20 anni sulla comorbidità tra cefalea ed epilessia in età evolutiva sono relativamente scarsi (De Romanis F et al., 1991; Andermann F et al., 1998; Andermann F, 2000; Yamane LE et al., 2004; Wirrell EC et al., 2006; Ludvigsson P et al. 2006; Piccinelli P et al., 2006; Clarke T et al., 2009) e la maggior parte di essi è basata su popolazioni di soggetti con epilessia (De Romanis F et al., 1991; Andermann F et al., 1998; Andermann F, 2000; Yamane LE et al., 2004; Wirrell EC et al., 2006; Ludvigsson P et al. 2006; Clarke T et al., 2009). Inoltre i diversi lavori sono difficili da confrontare in quanto sono stati condotti con metodologie diverse.

Il nostro studio valuta la prevalenza di epilessia in un'ampia casistica di bambini e adolescenti cefalalgici, diagnosticati secondo gli attuali criteri di classificazione delle cefalee (ICHD-II, 2004) e delle epilessie (ILAE, 1989). Si tratta di uno studio retrospettivo implementato da una recente valutazione longitudinale che ha permesso di acquisire informazioni sul follow-up.

Come atteso, abbiamo riscontrato un'associazione statisticamente significativa tra emicrania ed epilessia. Infatti la prevalenza di emicrania nei soggetti con epilessia

(82,1%) è molto maggiore rispetto a quella dei soggetti senza epilessia (52%) ( $p = 0.014$ ), ed il rischio di emicrania nei soggetti con epilessia è risultato 4,5 volte più elevato rispetto al rischio di cefalea tensiva (Toldo I et al., 2010).

In uno studio prospettico condotto su 50 bambini con epilessia, il 46% soffriva di cefalea e 10 dei 23 (43,5%) cefalalgici soffriva di emicrania (Yamane LE et al., 2004). La maggior parte dei soggetti cefalalgici aveva un'età superiore a 10 anni (54,5%) ed era affetta da un'epilessia idiopatica (65,2%) (Yamane LE et al., 2004).

Diversamente dallo studio di Yamane LE et al. (2004), nei nostri casi il rapporto maschi/femmine era significativamente sbilanciato verso le femmine ( $p=0.03$ ), la maggior parte dei soggetti con comorbidità aveva un'età inferiore a 10 anni (60%) e una diagnosi di epilessia focale criptogenetica (60%); inoltre molti soggetti presentavano familiarità positiva per cefalea ed emicrania (rispettivamente 73,2%,  $p=0.0005$ ; 66%,  $p=0.02$ ). Nel 95% dei casi la cefalea era esordita nello stesso anno o successivamente alla diagnosi di epilessia (Yamane LE et al., 2004), come riscontrato anche nei nostri casi.

In letteratura è stata suggerita una forte associazione tra ECA ed epilessia sia negli adulti che nei bambini (Ludvigsson P et al., 2006; Piccinelli P et al., 2006; Leninger T et al., 2003). Negli adulti, la frequenza di ECA è risultata significativamente maggiore nei soggetti con comorbidità per epilessia (41%) rispetto ai soggetti senza (25,8%) (Leninger T et al., 2003). In uno studio caso-controllo in età evolutiva, il rischio di crisi epilettiche era aumentato solo nei bambini con ECA (di 3,7 volte) e non in quelli con ESA (Ludvigsson P et al., 2003).

Nei nostri casi, la prevalenza di ECA (12,5%) è simile a quanto riscontrato (16,8%) nello studio di Piccinelli P et al. (2006) relativo a 134 bambini e adolescenti con cefalea primaria; tuttavia è emerso che l'ECA non si associa ad un maggiore rischio di epilessia rispetto all'ESA e la prevalenza di epilessia è simile nei due gruppi di emicranici (ECA 5,8%, ESA 5,4%). Inoltre, nella maggior parte dei nostri casi (71%) l'epilessia precede l'esordio dell'ECA; questo dato escluderebbe un ruolo causale dell'ECA nell'epilessia, suggerito invece da altri Autori (Ludvigsson P et al., 2003). E' possibile che l'ECA e



l'epilessia condividano, quindi, fattori patogenetici comuni.

In letteratura, la prevalenza di epilessia negli emicranici varia tra l'1 e il 17% con una media del 5,9% (Andermann E et al., 1987; Hauser WA *et al.*, 1991; Haut SR et al., 2006) ed è significativamente maggiore rispetto a quella della popolazione generale che risulta di circa 0,5-1% (<http://www.who.int/topics/epilepsy>). Nello studio di Piccinelli P et al. (2006), la prevalenza di epilessia o crisi epilettiche isolate era 4.4%; dei tre casi con epilessia, tutti presentavano ECA, due di questi erano affetti da un'epilessia fotosensibile, mentre il terzo aveva un'epilessia temporale.

Nei nostri casi, la prevalenza di epilessia idiopatica o criptogenetica è del 3,1% nei cefalalgici e del 4.8% nei soggetti emicranici, ed è simile a quanto riportato da altri Autori (Andermann E et al., 1987; Andermann F et al., 1998; Andermann F, 2000; Piccinelli P et al., 2006). Inoltre negli emicranici il rischio di epilessia è risultato 3,2 volte più elevato rispetto ai soggetti con cefalea tensiva, mentre non differiva significativamente tra ECA ed ESA (Toldo I et al., 2010).

In alcuni lavori condotti su bambini con epilessia rolandica benigna, l'incidenza dell'emicrania era aumentata (Bladin PF, 1987) ed era maggiore rispetto ai bambini con epilessia focale non idiopatica (62% vs 8%) (Giroud M *et al.*, 1989). Tuttavia, il limite di tali studi è che essi sono basati su casistiche piccole e spesso non impiegano precisi criteri diagnostici per l'emicrania (Kinast M *et al.*, 1982; Giroud M *et al.*, 1989; Andermann F e Andermann E, 1992). Altri lavori, invece, non supportano l'associazione tra emicrania ed epilessia rolandica benigna (Santucci M *et al.*, 1985; Andermann F e Zifkin B, 1998). Nello studio di Wirrell EC et al. (2006) i bambini con epilessia rolandica benigna presentavano, rispetto al gruppo di controllo, una maggiore prevalenza di emicrania e di equivalenti emicranici; tuttavia, tale prevalenza non differiva da quella riscontrata nei bambini con epilessia focale criptogenetica o sintomatica, dimostrando che le epilessie parziali sono associate ad un'aumentata prevalenza di emicrania, indipendentemente dall'eziologia (Wirrell EC *et al.*, 2006).

Nei nostri casi con comorbidità prevalgono le epilessie focali (76,8%) e, negli emicranici il rischio di epilessia focale criptogenetica è risultato 3 volte maggiore

rispetto al rischio di epilessia focale idiopatica (Toldo I et al., 2010). Questo riscontro è di particolare interesse poiché differisce da quanto riportato in lavori precedenti, basati prevalentemente su popolazioni di soggetti reclutati in quanto affetti da epilessia e non di cefalalgici come nel nostro studio. Possono essere formulate alcune ipotesi a questo riguardo. Innanzitutto la presenza, nel medesimo Dipartimento di Pediatria, anche di un Servizio di Neurofisiologia pediatrico di terzo livello a cui afferiscono molti soggetti affetti da epilessie parziali (prevalentemente criptogenetiche e sintomatiche) può giustificare un relativo eccesso di questa tipologia di pazienti nella nostra casistica di cefalalgici. Inoltre la maggior prevalenza di epilessie criptogenetiche rispetto a quelle idiopatiche nei bambini con epilessia potrebbe di per se stessa spiegare almeno in parte la prevalenza delle epilessie criptogenetiche tra gli emicranici. Infine la presenza di fattori eziologici comuni, attualmente ancora non noti, tra epilessie parziali criptogenetiche ed emicrania potrebbe contribuire a spiegare tale riscontro. Ulteriori studi e una migliore caratterizzazione eziologica futura nell'ambito delle epilessie criptogenetiche contribuiranno a spiegare questa associazione.

La risposta fotoparossistica all'EEG è stata evidenziata nel 12,5% dei casi con comorbidità, e questo supera di gran lunga quanto riscontrato rispettivamente in individui sani di età compresa tra i 6 e 18 anni (1,4%), in pazienti con epilessia (5%) e in bambini con cefalee primarie (media 8%; 8,9% in ESA, 7,8% in ECA, 6,7% in CTE) (Kasteleijn-Nolst T et al., 2002; Kasteleijn-Nolst T et al., 2003; Wendorff J et al., 2005; Piccinelli P et al., 2006; Piccioli M et al., 2009).

Nei soggetti emicranici con epilessia, analizzati nel nostro studio, la prevalenza complessiva di sindromi periodiche è risultata dell'8,6%, sovrapponibile quindi a quanto riscontrato precedentemente in pazienti emicranici (9,8%) analizzati in centri specialistici (Lanzi G et al., 1983; Al-Twajri et al., 2002; Abu-Arafeh I et al., 1995). In letteratura mancano lavori relativi alle sindromi periodiche classificate secondo gli attuali criteri ICHD-II (2004) nei soggetti con epilessia.

La familiarità positiva per cefalea ed emicrania è stata riscontrata rispettivamente nel 73,2% e nel 66% dei nostri casi. Non abbiamo trovato una correlazione significativa tra

la familiarità per emicrania e il tipo di cefalea o di epilessia dei probandi (Toldo I et al., 2010). Invece la familiarità per epilessia, presente nel 39% dei casi con comorbidità, supera di gran lunga quanto riportato in altre casistiche (9.5%) (Piccinelli P et al., 2006).

In passato sono stati proposti, per spiegare la comorbidità tra emicrania ed epilessia, tre modelli alternativi: a) un meccanismo causale unidirezionale; b) fattori di rischio ambientali comuni o c) fattori di rischio genetici comuni (Ottman R et al., 1996).

Come precedentemente riportato (De Romanis F et al., 1991; Bigal ME et al., 2003; Lipton RB et al., 1994; Sances G et al., 2009), i nostri risultati consentono di escludere queste tre ipotesi, poiché l'esordio dell'epilessia precedeva quello dell'emicrania nella maggior parte dei casi, soprattutto nell'ECA e non abbiamo trovato una correlazione significativa tra la familiarità per emicrania e il tipo di cefalea e di epilessia del probando.

Due rare situazioni cliniche in cui vi è una notevole sovrapposizione tra cefalea ed epilessia e di difficile diagnosi sono la “*migraine epilepsy*” e la “cefalea ictale epilettica” (Yankovsky AE et al., 2005; Parisi P et al., 2008; Parisi P et al., 2009). In entrambi i casi, l'EEG durante gli attacchi di cefalea è essenziale per la diagnosi.

La *migraine epilepsy* (1.5.5 ICHD-II) è una particolare condizione in cui una crisi epilettica si presenta durante o entro 1 ora dall'inizio di un'aura emicranica, e rassomiglia alle crisi epilettiche occipitali, che possono essere misconosciute senza una registrazione EEG (Parisi P et al., 2008).

Raramente la cefalea (non solo l'emicrania) può rappresentare l'unica manifestazione di una crisi epilettica, ed è stato proposto che il nuovo termine “cefalea ictale epilettica” sia incluso in entrambe le Classificazioni (Yankovsky AE et al., 2005; Parisi P et al., 2009). Nella nostra casistica nessun paziente ha presentato episodi di *migraine epilepsy* o cefalea ictale epilettica.

In letteratura nei bambini con associazione di cefalea ed epilessia, è riportata una relazione temporale tra cefalea e crisi epilettiche in più di un terzo dei casi (Yamane LE et al., 2004) e, la cefalea post-critica è risultata più frequente nei bambini con epilessia

occipitale (Andermann F e Zifkin B, 1998). Nello studio di Wirrell (2006) la cefalea post-critica era più frequente nei bambini con epilessia focale criptogenetica o sintomatica rispetto ai bambini con epilessia rolandica (40% vs 7%) ed in circa la metà dei casi aveva caratteristiche emicraniche. Inoltre nel 15% dei casi di epilessia focale criptogenetica o sintomatica, la cefalea post-critica rappresenta l'unico tipo di cefalea, mentre nessun bambino con epilessia rolandica presenta esclusivamente una cefalea post-critica (Wirrell EC et al., 2006). Circa il 50% dei pazienti adulti epilettici lamentano cefalea post-critica, benché la prevalenza possa variare in funzione del tipo di epilessia con una maggiore prevalenza nelle epilessie parziali occipitali (D'Alessandro R et al., 1987; Shon F et al., 1987; Bernasconi A et al., 2001; Ito M et al., 2004; Yankovsky AE et al., 2005). Una cefalea di tipo emicranico viene riferita dal 26% dei soggetti con cefalea post-critica, con una maggiore prevalenza nei soggetti affetti da epilessia delle regioni posteriori (occipitale e temporale) rispetto all'epilessia frontale (De Simone R *et al.*, 2007). I dati della letteratura suggeriscono che la cefalea post-critica è una manifestazione che fa parte della crisi epilettica e la sua incidenza non è influenzata da una storia precedente di emicrania (De Simone R *et al.*, 2007).

Nei nostri casi, la cefalea post-critica era presente in circa un terzo dei casi (34%) con comorbidità e la maggior parte di questi (84%) presentava attacchi di emicrania indipendenti dalle crisi epilettiche; tuttavia nei soggetti con emicrania non è stato riscontrato un maggior rischio di cefalea post-critica rispetto ai soggetti con cefalea tensiva ( $p=0.58$ ) (Toldo I et al., 2010). I nostri dati confermano, quindi, l'ipotesi che la cefalea post-critica sia una manifestazione strettamente associata alla crisi epilettica e che non dipenda dal tipo di cefalea del soggetto. Abbiamo, inoltre, riscontrato una maggiore prevalenza di cefalea post-critica nei soggetti con epilessia temporo-occipitale criptogenetica rispetto agli altri tipi di epilessia, come precedentemente riportato (D'Alessandro R et al., 1987; Shon F et al., 1987; Bernasconi A et al., 2001; Ito M et al., 2004; Yankovsky AE et al., 2005; Wirrell EC et al., 2006).

Attualmente molti Autori ritengono che un'aumentata eccitabilità cerebrale può accrescere il rischio sia di emicrania che di epilessia e potrebbe spiegare la comorbidità

(Leninger T et al., 2003; Bigal ME et al., 2003; Yankovsky AE et al., 2005; Rogawski MA et al., 2008). C'è un notevole interesse nella possibilità che polimorfismi genetici in canali ionici o in geni codificanti altre molecole coinvolte nella generazione del potenziale e nel mantenimento della stabilità della membrana cellulare possano contribuire alla suscettibilità per l'emicrania e l'epilessia (Wessman M et al., 2007; Rogawski MA et al., 2008).

Possibili sviluppi futuri delle ricerche su comorbidità tra emicrania ed epilessia comprendono l'analisi di geni implicati nei due disturbi, tra cui quelli codificanti per canali ionici, nell'ipotesi che un'associazione di varianti polimorfe o di mutazioni funzionalmente "non gravi" possano condizionare o, almeno in parte, contribuire all'associazione tra forme comuni di emicrania ed epilessia.

L'analisi della comorbidità tra emicrania ed epilessia potrebbe aiutare a identificare sottogruppi omogenei di pazienti per studi clinici e genetici più mirati rispetto a popolazioni costituite da soggetti affetti solo da forme comuni di emicrania. Infine la comprensione dei meccanismi patogenetici alla base della comorbidità tra emicrania ed epilessia potrebbe contribuire a migliorare il loro trattamento farmacologico.

## 5.2 LO STUDIO GENETICO

Lavori precedenti hanno dimostrato che l'emigrania emiplegica familiare, in cui sono state riscontrate mutazioni di geni codificanti per canali ionici (CACNA1A, ATP1A2, SCN1A) può essere associata a crisi epilettiche (Chioza B et al., 2001; Jouvenceau A et al., 2001; Chioza B et al., 2002). L'analisi molecolare dei geni CACNA1A e ATP1A2 condotta in soggetti affetti da ESA ed ECA, ha dimostrato che questi due geni non risultano coinvolti nella forme comuni di emigrania (Ducros A et al., 2002; Jen JC et al., 2004; Kirchmann M et al., 2006; Wessman M et al., 2007), mentre studi simili non hanno preso in esame il gene SCN1A.

La comorbidità tra emigrania ed epilessia potrebbe permettere di evidenziare un sottogruppo clinico di pazienti più omogeneo e consentire di effettuare studi genetici più mirati rispetto a quelli condotti su soggetti con forme comuni di emigrania. Questa ipotesi è confermata dallo studio di Deprez L et al. (2007), effettuato su 20 famiglie con emigrania ed epilessia, che dimostra la presenza di mutazioni del gene ATP1A2 nel 10% dei casi, suggerendo quindi di effettuare l'analisi molecolare di tale gene nei casi che presentano comorbidità tra emigrania ed epilessia e familiarità per emigrania o epilessia.

Nel nostro studio l'analisi molecolare dei 5 polimorfismi esonici codificanti del gene SCN1A è stata effettuata su un'ampia casistica costituita da 49 soggetti con comorbidità tra cefalea primaria ed epilessia idiopatica o criptogenetica e da 100 controlli sani non emigranici.

I nostri risultati consentono di confermare che lo SNP c.3199A>G dell'esone 16 costituisce un polimorfismo, mentre gli altri SNPs segnalati nel data base *NCBI* non possono essere considerati dei polimorfismi veri e propri, in quanto non sono stati riscontrati in nessuno dei 298 alleli (tra casi e controlli) esaminati.

Per quanto riguarda il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 che presenta una eterozigotà significativa (0.33 nel data base *NCBI*, 0.47 nel nostro studio), i nostri dati escludono un'associazione tra questo polimorfismo e la comorbidità tra cefalea ed

epilessia, poiché la distribuzione allelica e genotipica del polimorfismo non differisce significativamente tra pazienti e controlli ( $p > 0.05$ ).

A nostra conoscenza questo è il primo studio che valuta il genotipo di polimorfismi del gene SCN1A in una popolazione di soggetti con comorbidità tra cefalea ed epilessia.

Il gene SCN1A è stato finora molto studiato in ampie casistiche di soggetti affetti da epilessia mioclonica severa (Ohmori I et al., 2002; Nabbout R et al., 2003; Depienne C et al., 2008) o in famiglie con epilessie generalizzate idiopatiche e crisi febbrili plus (GEFS+) (Wallace RH et al., 2001; Bonanni P et al., 2004) ed anche in alcune famiglie con convulsioni febbrili (Malacarne M et al., 2002). Tali studi contengono anche i dati relativi alla frequenza del polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16, documentando frequenze alleliche e genotipiche sovrapponibili tra pazienti e controlli. Il polimorfismo c.3199G>A dell'esone 16 è stato analizzato specificatamente in soggetti con convulsioni febbrili (Chou IC et al., 2003) o con vertigine parossistica emicranica (von Brevern M et al., 2006) escludendo una correlazione positiva. In due studi recenti l'analisi del polimorfismo c.3199A>G del gene SCN1A è stata effettuata in soggetti di origine asiatica con epilessia distinti in farmacosensibili e farmaco-resistenti (Kwan P et al., 2008; Lakhan R et al., 2009); in entrambi gli studi, confrontando la distribuzione del genotipo del polimorfismo tra soggetti farmacosensibili e farmaco-resistenti non emerge una correlazione significativa. Solo nello studio di Lakhan R et al. (2009) viene riportata una correlazione statisticamente significativa tra il genotipo AG del polimorfismo c.3199G>A del gene SCN1A e la presenza di epilessia nei casi rispetto ai controlli; tuttavia tale dato merita ulteriori approfondimenti poiché la significatività statistica è stata riscontrata solo nei soggetti eterozigoti, e quindi è più difficilmente spiegabile dal punto di vista di plausibilità biologica.

Complessivamente i risultati degli studi finora condotti sostengono che il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 è un polimorfismo non associato a fenotipi patologici; con i nostri risultati possiamo confermare che questo è valido anche nei soggetti cefalalgici ed emicranici.

Abbiamo riscontrato una mutazione missenso c.1811G>A (p.604R>H) a carico dell'esone 11 in un paziente affetto da cefalea tensiva episodica ed epilessia con assenze dell'infanzia. In letteratura tale mutazione è già nota (Escayg A et al., 2001; Harkin LA et al., 2007; Depienne C et al., 2008). Escayg A et al. (2001) identifica la stessa mutazione c.1811G>A dell'esone 11 (p.604R>H) in due soggetti con epilessia mioclonica giovanile e sottolinea che tale mutazione interrompe un sito di consenso per una proteina chinasi A (PKA) che è conservata nei quattro principali canali del sodio del sistema nervoso centrale. Tuttavia tale mutazione non cosegregava con il fenotipo epilettico nelle due famiglie con epilessia mioclonica giovanile (Escayg A et al., 2001) e aveva un effetto minore sulle correnti ioniche nello studio di Smith RD et al. (1997); la possibilità che tale mutazione sia non patogena è stato sostenuto da due lavori successivi (Harkin LA et al., 2007; Depienne C et al., 2008). Il significato patogenetico di tale mutazione nel nostro caso andrà ulteriormente chiarito effettuando l'analisi genetica ai genitori del paziente.

Confermiamo, inoltre, che la variante missenso c.5782C>G (p.1928R>G) dell'esone 26 identificata in un unico controllo sano non emicranico tra i 100 esaminati è un polimorfismo missenso raro, come riportato precedentemente (Wallace RH et al. 2001; de Vries B et al., 2007; Depienne C et al., 2008; Zucca C et al., 2008).

Il nostro studio sembra escludere un ruolo del gene SCN1A nella patogenesi dell'emicrania e soprattutto nella comorbidità tra questa e l'epilessia; tuttavia il limite del presente studio è dato dal fatto che è stato esaminato solo parte del gene, in quanto l'analisi completa del gene appariva eccessivamente dispendiosa, considerato il numero elevato di esoni (pari a 26) del gene SCN1A e in base alla negatività in altri studi (Wallace RH et al., 2001; von Brevern M et al., 2006).

I nostri dati dimostrano, come sostenuto da alcuni Autori (Montagna P, 2008), che il gene SCN1A non risulta implicato nella patogenesi delle forme comuni di emicrania, neppure quando il fenotipo viene ristretto dalla presenza di comorbidità con epilessia. Il gene SCN1A ha un ruolo importante, come è noto da tempo, nella patogenesi di alcune sindromi epilettiche (epilessia mioclonica severa e GEFS+) ed è stato recentemente



associato a nuovi e diversi fenotipi clinici, come le epilessie criptogenetiche sia focali che generalizzate (Harkin LA et al., 2007) e l'epilessia di Panayiotopoulos (Grosso S et al., 2007; Orrico A et al., 2009)

Il riscontro di una mutazione missenso (c.1811G>A, esone 11; p.604R>H) del gene SCN1A in soggetti con epilessie generalizzate idiopatiche (epilessia con assenze dell'infanzia ed epilessia mioclonica giovanile) suggerisce che lo spettro fenotipo associato al gene SCN1A potrebbe ulteriormente espandersi. Tuttavia questo dato andrà confermato con altri studi.

Un altro aspetto rilevante di questo studio è stato l'impiego di una metodica innovativa, l'HRM, per l'analisi molecolare del gene SCN1A. L'HRM offre notevoli vantaggi rispetto alle metodiche tradizionali (SSCP, DGGE, DHPLC, ecc), in quanto non richiede fasi di manipolazione del materiale genetico post-amplificazione, è poco costosa, ha un'eccellente sensibilità e specificità e soprattutto consente l'analisi concomitante di un numero elevato di campioni, aumentando la riproducibilità delle analisi e riducendo notevolmente i tempi di lavoro. Queste caratteristiche hanno un'importanza peculiare, soprattutto alla luce del fatto che l'analisi genetica di patologie multifattoriali, come la cefalea e l'epilessia, richiede lo studio di un numero elevato di soggetti e molto spesso implica l'analisi di diversi polimorfismi negli stessi pazienti.

L'HRM potrebbe quindi costituire la nuova metodologia di analisi molecolare del gene SCN1A, che attualmente viene usualmente effettuata con tecniche di screening (DHPLC) e sequenziamento diretto. La messa a punto di protocolli di diagnostica molecolare più efficienti e affidabili potrebbe consentire una valutazione più ampia del ruolo del gene SCN1A e di altri geni codificanti per canali ionici nelle diverse epilessie e sindromi epilettiche.

## 6. CONCLUSIONI

---

La comorbidità tra cefalea ed epilessia è relativamente frequente nei bambini e adolescenti. I nostri dati, per quanto riguarda la parte clinica, confermano una forte associazione tra emicrania ed epilessia, senza differenze significative tra ESA ed ECA. L'emicrania è associata ad una maggiore prevalenza di epilessia focali, in particolare criptogenetiche. Attacchi ricorrenti di emicrania non sembrano causare l'epilessia, poiché nella maggior parte dei casi, soprattutto nei soggetti con ECA, l'esordio dell'epilessia ha preceduto quello dell'emicrania.

Nei casi con comorbidità, gli emicranici non hanno un maggior rischio di cefalea post-critica rispetto ai soggetti con cefalea tensiva. La fotosensibilità all'EEG e la familiarità per epilessia sono frequenti nei casi con comorbidità tra cefalea ed epilessia.

L'analisi della relazione clinica tra cefalea, in particolare l'emicrania, e l'epilessia potrebbe contribuire a comprendere i meccanismi patogenetici alla base delle due condizioni, soprattutto quando sono presenti in comorbidità. Sono, comunque, necessari ulteriori studi, basati sugli attuali sistemi di classificazione dei due disturbi.

Per quanto riguarda lo studio genetico, a nostra conoscenza questo è il primo studio che valuta il genotipo di polimorfismi del gene SCN1A in una popolazione di soggetti con comorbidità tra cefalea ed epilessia.

I nostri risultati confermano che il polimorfismo c.3199A>G dell'esone 16 non è associato a fenotipi patologici anche nei soggetti cefalalgici ed emicranici, mentre gli altri 4 polimorfismi esaminati non sono dei polimorfismi veri e propri e non vanno ulteriormente indagati.

Il nostro studio sembra escludere un ruolo del gene SCN1A nella comorbidità tra l'emicrania e l'epilessia. Il gene SCN1A è un gene maggiore nelle epilessie, e in tale ambito va ulteriormente indagato.

L'HRM potrebbe costituire una nuova metodologia, più rapida ed efficiente, di analisi molecolare del gene SCN1A. La messa a punto di protocolli di diagnostica molecolare

più efficienti e affidabili potrebbe consentire una valutazione più ampia del ruolo del gene SCN1A e di altri geni codificanti per canali ionici nelle diverse epilessie e sindromi epilettiche.

## 7. BIBLIOGRAFIA

---

Abu-Arafeh I, Russel G. Prevalence and clinical features of abdominal migraine compared with those of migraine headache. *Arch Dis Child* 1995;72:413-417.

Ambrosini A, D'Onofrio M, Grieco GS, Di Mambro A, Montagna G, Fortini D, Nicoletti F, Nappi G, Sances G, Schoenen J, Buzzi MG, Santorelli FM, Pierelli F. Familial basilar migraine associated with a new mutation in the ATP1A2 gene. *Neurology* 2005;65:1826-1828.

Amery WK. Migraine and epilepsy: a retrospective view. *Funct Neurol* 1986;1(4):559-61.

Andermann E, Andermann FA. Migraine-epilepsy relationships: epidemiological and genetic aspects. In: Andermann F, Lugaresi E, eds. *Migraine and epilepsy*. Boston: Butterworth Publishers, 1987: 281-291.

Andermann FA, Andermann E. Migraine and epilepsy, with special reference to the benign epilepsies of childhood. *Epilepsy Res* 1992;6:207-214.

Andermann F, Zifkin B. The benign occipital lobe epilepsies of childhood: an overview of the idiopathic syndromes and of the relationship to migraine. *Epilepsia* 1998; 39: 9-23.

Andermann F. Migraine and the benign partial epilepsies of childhood: evidence for an association. *Epileptic Dis* 2000; S1 (2): 37-39.

Anttila V, Kallela M, Oswell G, Kaunisto MA, Nyholt DR, Hamalainen E, Havanka H, Ilmavirta M, Terwilliger J, Sobel E, Peltonen L, Kaprio J, Farkkila M, Wessman M, Palotie A. Trait components provide tools to dissect the genetic susceptibility of migraine. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 85-99.

Anttila P. Tension-type headache in childhood and adolescence. *Lancet Neurol* 2006;5(3):268-74.

Balottin U, Borgatti R, Zambrino CA, Lanzi G. Clinical characteristics and long-term outcome of migraine with aura in children and adolescents. *Dev Med Child Neurol* 1997;39(1): 26-30.

Barabas G, Matthews WS, Ferrari M. Childhood migraine and motion sickness. *Pediatrics* 1983;72(2):188-90.

Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A, Nazos K, Crippa F, Baschiroto C, Zucca C, Bersano A, Dolcetta, D, Boneschi FM, Barone V, Casari G. A novel mutation in the ATP1A2 gene causes alternating hemiplegia of childhood. *J Med Genet* 2004;41:621-628.

Bernasconi A, Andermann F, Bernasconi N, Reutens DC, Dubeau F. Lateralizing value of peri-ictal headache: A study of 100 patients with partial epilepsy. *Neurology* 2001;56(1):130-2.

Bigal ME, Lipton RB; Cohen J. Epilepsy and migraine. *Epilepsy Behav* 2003;S2(4):13-24.

Bladin PF. The association of benign rolandic epilepsy with migraine in: Andermann F, Lugaresi E, eds. *Migraine and epilepsy*. Boston: Butterworth Publishers, 1987;145-152

Bonanni P, Malcarne M, Moro F, Veggiotti P, Buti D, Ferrari AR, Parrini E, Mei D, Volzone A, Zara F, Heron SE, Bordo L, Marini C, Guerrini R. Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+): clinical spectrum in seven Italian families unrelated to SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutations. *Epilepsia* 2004;45(2):149-58.

Cau C. The Alice in Wonderland syndrome. *Minerva Med* 1999;90(10):397-401.

Chaves-Vischer V, Picard F, Andermann E, Dalla Bernardina B, Andermann F. Benign nocturnal alternating hemiplegia of childhood: six patients and long-term follow-up. *Neurology* 2001;57(8):1491-3.

Chioza B, Wilkie H, Nashef L, et al. Association between the alpha (1a) calcium channel gene CACNA1A and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 2001;56:1245-1246.

Chioza B, Nashef L, Asherson P, Makoff A. CACNA1A and P/Q-type calcium channels in epilepsy. *Lancet* 2002;359(9302):258.

Chou IC, Peng CT, Tsai FJ, Huang CC, Shi YR, Tsai CH. The lack of association between febrile convulsions and polymorphisms in SCN1A. *Epilepsy Res* 2003;54(1):53-7.

Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 2001;68(6):1327-32.

Claes LR, Deprez L, Suls A, Baets J, Smets K, Van Dyck T, Deconinck T, Jordanova A, De Jonghe P. The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool. *Hum Mutat* 2009;30(10):E904-20.

Clarke T, Baskurt Z, Strug LJ, Pal DK. Evidence of shared genetic risk factors for migraine and rolandic epilepsy. *Epilepsia* 2009;50:2428-33

Cuenca-León E, Corominas R, Fernández-Castillo N, Volpini V, Del Toro M, Roig M, Macaya A, Cormand B. Genetic analysis of 27 Spanish patients with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and childhood periodic syndromes. *Cephalalgia* 2008;28(10):1039-47.

D'Agostino DM, Andermann E, Xiong L, et al. Clinical and pedigree analysis in familial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1998; 39: 177.

D'Alessandro R, Sacquegna T, Pazzaglia P et al. Headache after partial complex seizures. In: Andermann FA, Lugaresi E (eds) *Migraine and epilepsy*. Butterworths, Boston, 1987:273–278.

De Fusco MD, Marconi R, Silvestri L, et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha 2 subunit associated with familial hemiplegic migraine. *Nat Gen* 2003; 33: 192-196.

De Romanis F, Buzzi MG, Cerbo R, Feliciani M, Assenza S, Agnoli A. Migraine and epilepsy with infantile onset and electroencephalographic findings of occipital spike-wave complexes. *Headache* 1991;31:378-383.

De Simone R, Ranieri A, Marano E, Beneduce L, Ripa P, Bilo L, Meo R, Bonavita V. Migraine and epilepsy: clinical and pathophysiological relations. *Neurol Sci* 2007;28 S2 2:150-5.

de Vries B, Freilinger T, Vanmolkot KR, Koenderink JB, Stam AH, Terwindt GM, Babini E, van den Boogerd EH, van den Heuvel JJ, Frants RR, Haan J, Pusch M, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Dichgans M. Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine. *Neurology* 2007;(23):2170-6.

Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, Gourfinkel-An I, Bouteiller D, Carpentier W, Keren B, Abert B, Gautier A, Baulac S, Arzimanoglou A, Cazeneuve C, Nabbout R, LeGuern E. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet* 2009;46(3):183-91.

Deprez L, Peeters K, Van Paesschen WV, et al. Familial occipitaltemporal lobe epilepsy and migraine with visual aura: linkage to chromosome 9. *Neurology* 2007;68 (12): 1-8.

Deprez L, Weckhuysen S, Peeters K, Deconinck T, Claeys KG, Claes LR, Suls A, Van Dyck T, Palmini A, Matthijs G, Van Paesschen W, De Jonghe P. Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations. *Epilepsia* 2008;49(3):500-8.

Dichigans M, Freilinger T, Eckstein G, et al. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 2005;366: 317-377.

Ducros A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. The genetics of migraine. *Lancet Neurol* 2002; 1(5): 285-93.

Ducros A. Familial and sporadic hemiplegic migraine. *Rev Neurol* 2008;164:216-24.

Engel J Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res* 2006;70(S1):5-10.

Eriksson KJ, Koivikko MJ. Prevalence, classification, and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. *Epilepsia* 1997;38(12):1275-82.

Escayg, A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nature Genet* 2000;24:343-345.

Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus--and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):866-73.

Feinstein AR. The pre-therapeutic classification of comorbidity in chronic disease. *J Chronic Dis* 1970;23:455-468

Fenwick P. Episodic dyscontrol. In Engel J Jr, Pedley TA, editors. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998;2767-74.



Freitag CM, May TW, Pfäfflin M, König S, Rating D. Incidence of epilepsies and epileptic syndromes in children and adolescents: a population-based prospective study in Germany. *Epilepsia* 2001;42(8):979-85.

Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y, Fukushima K, Watanabe M, Hara K, Morikawa T, Yagi K, Yamakawa K, Inoue Y. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 2003;126(3):531-46.

Gambardella A, Messina D, Le Piane E, et al. Familial temporal lobe epilepsy autosomal dominant inheritance in a large pedigree from southern Italy. *Epilepsy Res* 2000; 38: 127-132.

Giffin NJ, Benton S, Goadsby PJ. Benign paroxysmal torticollis of infancy: four new cases and linkage to CACNA1A mutation. *Dev Med Child Neurol* 2002;44: 490-493.

Giroud M, Couillault G, Arnould S, Dauvergne M, Dumas R, Nivelon JL. Epilepsy with rolandic paroxysms and migraine, a non-fortuitous association. Results of a controlled study. *Pediatric* 1989;44(8):659-64.

Grosso S, Orrico A, Galli L, Di Bartolo R, Sorrentino V, Balestri P. SCN1A mutation associated with atypical Panayiotopoulos syndrome. *Neurology* 2007;69(6):609-11.

Guerrini R. Epilepsy in children. *Lancet* 2006;367:499-524.

Guidetti V, Galli F. Evolution of headache in childhood and adolescence: an 8-year follow-up. *Cephalalgia* 1998;18(7):449-54.

Harkin LA, McMahon JM, Iona X, Dibbens L, Pelekanos JT, Zuberi SM, Sadleir LG, Andermann E, Gill D, Farrell K, Connolly M, Stanley T, Harbord M, Andermann F, Wang J, Batish SD, Jones JG, Seltzer WK, Gardner A; Infantile Epileptic Encephalopathy Referral Consortium, Sutherland G, Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer

IE. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* 2007;130(Pt 3):843-52.

Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota. *Epilepsia* 1991;32:429-445.

Haut SR, Bigal ME, Lipton RB. Chronic disorders with episodic manifestations: focus on epilepsy and migraine. *Lancet Neurol* 2006;5(2):148-57.

Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society (2004) The International Classification of Headache Disorders, 2nd edn. *Cephalalgia* 24(S1):9-160

Hershey AD, Winner P, Kabbouche MA, Gladstein J, Yonker M, Lewis D, Pearlman, E, Linder SL, Rothner AD, Powers SW. Use of the ICHD-II Criteria in the Diagnosis of Pediatric Migraine. *Headache* 2005;45:1288-1297.

International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1989;30:389-399.

Ito M, Adachi N, Nakamura F, Yokama T, Okamura T, Kato M, Kanemoto K, Nakano T, Matsuura M, Hara S. Characteristics of postictal headache in patients with partial epilepsy. *Cephalalgia* 2004;24:23-28.

Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW. Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology* 2005;65: 529-534.

Jouveneau A, Eunson LH, Spauschus A, et al. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet* 2001; 358: 801-807.

Kirchmann M, Thomsen LL, Olesen J. The CACNA1A and ATP1A2 genes are not involved in dominantly inherited migraine with aura. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141B(3):250-6.

Kanavakis E, Xaidara A, Papathanasiou-Klontza D, Papadimitiou A, Velentza A, Youroukos S. Alternating hemiplegia of childhood: a syndrome inherited with an autosomal dominant trait. *Dev Med Child Neurol* 2003;45: 833-836.

Kasteleijn-Nolst Trenité DGA, Hirsch E, Takahashi T. Photosensitivity, visual induced seizures and epileptic syndromes. In: Roger J, Bureau M, Dravet Ch et al (eds) *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*, 3rd edn. John Libbey & Co Ltd, Eastleigh, 2002;69-385.

Kasteleijn-Nolst Trenité DGA, Silva LCB, Manreza MLG. Prevalence of photo paroxysmal EEG responses in normal children and adolescents in Teofile Otoni, Brazil:2001-2002. *Epilepsia* 2003;44(S8):48.

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 : 139-141.

Kinast M, Lueders H, Rothner AD, Erenberg G. Benign focal epileptiform discharges in childhood migraine. *Neurology*,1982;32,1309-1311.

Kwan P, Poon WS, Ng HK, Kang DE, Wong V, Ng PW, Lui CH, Sin NC, Wong KS, Baum L. Multidrug resistance in epilepsy and polymorphisms in the voltage-gated sodium channel genes SCN1A, SCN2A, and SCN3A: correlation among phenotype, genotype, and mRNA expression. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18(11):989-98.

Lakhan R, Kumari R, Misra UK, Kalita J, Pradhan S, Mittal B. Differential role of sodium channels SCN1A and SCN2A gene polymorphisms with epilepsy and multiple drug resistance in the north Indian population. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68(2):214-20.

Lanzi G, Balottin U, Ottolini A, Rosano Burgio F, Fazzi E, Arisi D. Cyclic vomiting and recurrent abdominal pains as migraine or epileptic equivalents. *Cephalalgia* 1983;3(2):115-8.

Lanzi G, Balottin U, Fazzi E, Rosano FB. The periodic syndrome in pediatric migraine sufferers. *Cephalalgia* 1983;3 (S1):91-93.

Lanzi G, Balottin U, Borgatti R. A prospective study of juvenile migraine with aura. *Headache* 1994; 34(5): 275-8.

Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 1994; 117: 99-210.

Leniger T, von den Driesch S, Isbruch K, Diener HC, Hufnagel A. Clinical characteristics of patients with comorbidity of migraine and epilepsy. *Headache* 2003; 43(6):672-7.

Lewis DW. Pediatric migraine. *Pediatr Rev* 2007;28(2):43-53.

Jen JC, Kim GW, Dudding KA, Baloh RW. No mutations in CACNA1A and ATP1A2 in probands with common types of migraine. *Arch Neurol* 2004;61(6):926-8.

Lima MM, Padula NA, Santos LC, et al.: Critical analysis of the international classification of headache disorders diagnostic criteria (ICHD I-1988) and (ICHD II-2004), for migraine in children and adolescents. *Cephalalgia* 2005,25:1042–1047.

Lipton RB, Silberstein SD. Why study the comorbidity of migraine? *Neurology* 1994;44(S1):S4-5.

Ludvigsson P, Hesdorffer D, Olafsson E et al. Migraine with aura is a risk factor for unprovoked seizures in children. *Ann Neurol* 2006;59:210–213

Malacarne M, Madia F, Gennaro E, Vacca D, Güney AI, Buono S, Bernardina BD, Gaggero R, Gobbi G, Lispi ML, Malamaci D, Melideo G, Roccella M, Sferro C, Tiberti A, Vanadia F, Vigevano F, Viri F, Vitali MR, Bricarelli FD, Bianchi A, Zara F. Lack of SCN1A mutations in familial febrile seizures. *Epilepsia* 2002;43(5):559-62.

Marini C, Scheffer IE, Nabbout R, Mei D, Cox K, Dibbens LM, McMahon JM, Iona X, Carpintero RS, Elia M, Cilio MR, Specchio N, Giordano L, Striano P, Gennaro E, Cross JH, Kivity S, Neufeld MY, Afawi Z, Andermann E, Keene D, Dulac O, Zara F, Berkovic SF, Guerrini R, Mulley JC. SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: Implications for molecular diagnosis. *Epilepsia* 2009 Mar 11. [Epub ahead of print]

Marks DA, Ehrenberg BL. Migraine-related seizures in adults with epilepsy, with EEG correlation. *Neurology* 1993 Dec;43(12):2476-83.

Montagna P. Migraine: a genetic disease? *Neurol Sci* 2008;29(S1):47-51.

Mortimer J, Kay J, Jaron A. Epidemiology of headache and childhood migraine in an urban general practice using ad hoc, Valquist and IHS criteria. *Dev Med Child Neurol* 1992;34:1095-1101.

Mortimer MJ, Kay J, Jaron A. Clinical epidemiology of childhood abdominal migraine in an urban general practice. *Dev Med Child Neurol* 1993; 35 (3): 243-248.

Nabbout R, Kozlovski A, Gennaro E, Bahi-Buisson N, Zara F, Chiron C, Bianchi A, Brice A, Leguern E, Dulac O. Absence of mutations in major GEFS+ genes in myoclonic astatic epilepsy. *Epilepsy Res* 2003;56(2-3):127-33.

Nabbout R, Gennaro E, Dalla Bernardina B, Dulac O, Madia F, Bertini E, Capovilla G, Chiron C, Cristofori G, Elia M, Fontana E, Gaggero R, Granata T, Guerrini R, Loi M, La Selva L, Lispi ML, Matricardi A, Romeo A, Tzolas V, Valseriati D, Veggiotti P,

Vigevano F, Vallée L, Dagna Bricarelli F, Bianchi A, Zara F. Spectrum of SCN1A mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* 2003;60(12):1961-7.

Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, Oka E, Shimizu K. Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295(1):17-23.

Ohmori I, Ohtsuka Y, Ouchida M, Ogino T, Maniwa S, Shimizu K, Oka E. Is phenotype difference in severe myoclonic epilepsy in infancy related to SCN1A mutations? *Brain Dev* 2003;25(7):488-93.

Ohmori I, Ouchida M, Kobayashi K, Jitsumori Y, Inoue T, Shimizu K, Matsui H, Ohtsuka Y, Maegaki Y. Rasmussen encephalitis associated with SCN 1 A mutation. *Epilepsia* 2008;49(3):521-6.

Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt-Hansen P, Welch KMA. *The Headaches*, 3rd edition. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, 2006.

Ölmez A, Kose G, Turanlı G. Cyclic vomiting with generalized epileptiform discharges responsive to topiramate therapy. *Pediatr Neurol* 2006;35(5):348-51.

Orrico A, Galli L, Grosso S, Buoni S, Pianigiani R, Balestri P, Sorrentino V. Mutational analysis of the SCN1A, SCN1B and GABRG2 genes in 150 Italian patients with idiopathic childhood epilepsies. *Clin Genet* 2009;75(6):579-81.

Ottman R, Lipton RB. Comorbidity of migraine and epilepsy. *Neurology* 1994;44:2105-2110.

Ottman R, Lipton RB. Is the comorbidity of epilepsy and migraine due to a shared genetic susceptibility? *Neurology* 1996;47:918-924.

Panayiotopoulos CP. Elementary visual hallucinations, blindness, and headache in idiopathic occipital epilepsy: differentiation from migraine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66(4):536-540.

Panayiotopoulos CP. “Migrainepsy” and the significance of differentiating occipital seizures from migraine. *Epilepsia* 2006, 47:806–808

Parisi P, Piccioli M, de Sneeuw S, de Kovel C, van Nieuwenhuizen O, Buttinelli C, Villa MP, Kasteleijn-Nolst Trenité DG. Redefining headache diagnostic criteria as epileptic manifestation? *Cephalalgia* 2008;28:408-9.

Parisi P. Who's still afraid of the link between headache and epilepsy? Some reactions to and reflections on the article by Marte Helene Bjørk and co-workers. *J Headache Pain* 2009;10:327-9.

Parisi P. Why is migraine rarely, and not usually, the sole ictal epileptic manifestation? *Seizure* 2009;18:309-12.

Piccioli M, Parisi P, Tisei P, Villa MP, Buttinelli C, Kasteleijn-Nolst Trenité DG. Ictal headache and visual sensitivity. *Cephalalgia* 2009;29:194-203.

Piccinelli P, Borgatti R, Nicoli F, Calcagno P, Bassi MT, Quadrelli M, Rossi G, Lanzi G, Balottin U. Relationship between migraine and epilepsy in pediatric age. *Headache* 2006; 46(3): 413-21.

Pietrobon D. Migraine: New Molecular Mechanisms. *Neuroscientist* 2005; 11(4):373–386.

Raieli V, Eliseo M, Pandolfi E, La Vecchia M, La Franca G, Puma D, Ragusa D. Recurrent and chronic headaches in children below 6 years of age. *J Headache Pain* 2005;6(3):135-42.

Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry* 2004;10:1748–1754.

Rogawski MA. Common pathophysiologic mechanisms in migraine and epilepsy. *Arch Neurol* 2008;65:709-14.

Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P. *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. 3rd edition. John Libbey 2002.

Roubertie A, Echenne B, Leydet J, Soete S, Krams B, Rivier F, Riant F, Tournier-Lasserre E. Benign paroxysmal tonic upgaze, benign paroxysmal torticollis, episodic ataxia and CACNA1A mutation in a family. *J Neurol* 2008;255(10):1600-2.

Russell MB, Iversen HK, Olesen J. Improved description of the migraine aura by a diagnostic aura diary. *Cephalalgia* 1994;14(2):107-17.

Sacco S, Olivieri L, Bastianello S, Carolei A. Comorbid neuropathologies in migraine. *J Headache Pain* 2006;7(4):222-30.

Sances G, Guaschino E, Perucca P, Allena M, Ghiotto N, Manni R. Migralepsy: a call for a revision of the definition. *Epilepsia* 2009;50:2487-96.

Santucci M, Giovanardi Rossi P, Ambrosetto G, Sacquegna T, D'Alessandro R. Migraine and benign epilepsy with rolandic spikes in childhood: a case control study. *Dev Med and Child Neurol* 1985;27:60-62

Selby G, Lance JW. Observation of 500 cases of migraine and allied vascular headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960;23:23-32.

Shon F, Blau JN. Post-epileptic headache and migraine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50:1148–1152



Sillanpää M, Piekkala P, Kero P. Prevalence of headache at preschool age in an unselected child population. *Cephalalgia* 1991;11(5):239-42.

Silberstein SD, Young WB. Migraine aura and prodrome. *Semin Neurol* 1995;15(2):175-82.

Smith RD, Goldin AL. Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *J Neurosci* 1997;17(16):6086-93.

Spadaro M, Ursu S, Lehmann-Horn F, Veneziano L, Antonini G, Giunti P, Frontali M, Jurkat-Rott K. A G301R Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mutation causes familial hemiplegic migraine type 2 with cerebellar signs. *Neurogenetics* 2004;5:177-185.

Swoboda KJ, Kanavakis E, Xaidara A, Johnson JE, Leppert MF, Schlesinger-Massart MB, Ptacek LJ, Silver K, Youroukos S. Alternating hemiplegia of childhood or familial hemiplegic migraine?: a novel ATP1A2 mutation. *Ann Neurol* 2004; 55: 884-887.

Thomsen LL, Kirchmann M, Bjornsson A, Stefansson H, Jensen RM, Fasquel AC, Petursson H, Stefansson M, Frigge ML, Kong A, Gulcher J, Stefansson K, Olesen J. The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine. *Brain* 2007;130(Pt 2):346-56.

Todt U, Dichgans M, Jurkat-Rott K, Heinze A, Zifarelli G, Koenderink JB, Goebel I, Zumbroich V, Stiller A, Ramirez A, Friedrich T, Gobel H, Kubisch C. Rare missense variants in ATP1A2 in families with clustering of common forms of migraine. *Hum Mutat* 2005;26:315-321.

Toldo I, Perissinotto E, Menegazzo F, Boniver C, Sartori S, Salviati L, Clementi M, Montagna P, Battistella PA. Comorbidity between headache and epilepsy in a pediatric headache center. *J Headache Pain* 2010, in press; accepted 12 January 2010.

Van den Maagdenberg AMJM, Kors EE, Brunt ER, et al. Three novel truncating mutations and one novel missense mutation in the CACNA1A gene causing episodic ataxia type 2. *J Neurol* 2002; 249: 1515-1519.

Vankmolkot KR, Kors EE, Hottenga JJ, et al. Novel mutations in the Na,K-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol* 2003; 54: 360-366.

von Brevern M, Ta N, Shankar A, Wiste A, Siegel A, Radtke A, Sander T, Escayg A. Migrainous vertigo: mutation analysis of the candidate genes CACNA1A, ATP1A2, SCN1A, and CACNB4. *Headache* 2006;46(7):1136-41.

Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George AL Jr, Mulley JC, Berkovic SF. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):859-65.

Wallace RH, Hodgson BL, Grinton BE, Gardiner RM, Robinson R, Rodriguez-Casero V, Sadleir L, Morgan J, Harkin LA, Dibbens LM, Yamamoto T, Andermann E, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE. Sodium channel alpha1-subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology* 2003;61(6):765-9.

Wendorff J, Juchniewicz B. Photosensitivity in children with idiopathic headaches. *Neurol Neurochi Pol* 2005;39 (S1):S9-16

Wessman M, Kaunisto MA, Kallela M, Palotie A. The molecular genetics of migraine. *Ann Med* 2004;36(6):462-73.

Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A, Ophoff RA. Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol* 2007;6(6):521-32.

White H, Potts G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science), HR1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology) NGRLW\_HRM\_1.0 (2006).

Winner P, Powers SW, Kabbouche MA, Hershey AD. Diagnosing and Managing Headache in Children. Bc Decker Inc. Hamilton, Ontario, 2007.

Wirrell EC, Hamiwka LD. Do children with benign rolandic epilepsy have a higher prevalence of migraine than those with other partial epilepsies or nonepileptic controls? *Epilepsia* 2006; 47(10):1674-1681.

Yamane LE, Montenegro MA, Guerreiro MM. Comorbidity headache and epilepsy in childhood. *Neuropediatrics* 2004;35:99-102.

Yankovsky AE, Andermann F, Bernasconi A. Characteristics of headache associated with intractable partial epilepsy. *Epilepsia* 2005;46:1241-1245.

Zwart JA, Dyb G, Holmen TL, Stovner LJ, Sand T. The prevalence of migraine and tension-type headaches among adolescents in Norway: the Nord-Trøndelag Health Study (Head-HUNT-Youth), a large population-based epidemiological study. *Cephalalgia* 2004;24: 373–79.

Zucca C, Redaelli F, Epifanio R, Zanotta N, Romeo A, Lodi M, Veggiotti P, Airoldi G, Panzeri C, Romaniello R, De Polo G, Bonanni P, Cardinali S, Baschiroto C, Martorell L, Borgatti R, Bresolin N, Bassi MT. Cryptogenic epileptic syndromes related to SCN1A: twelve novel mutations identified. *Arch Neurol* 2008;65(4):489-94.

## 8. RINGRAZIAMENTI

---

Ringrazio tutti coloro che hanno collaborato a questo lavoro:

Pier Antonio Battistella

Maurizio Clementi

Leonardo Salviati

Alice Bruson

Alberto Casarin

Clementina Boniver

Egle Perissinotto

Pasquale Montagna

Sartori Stefano

Francesca Menegazzo

Un particolare ringraziamento a:

i bambini e le loro Famiglie

il personale infermieristico

i volontari sani

Anna Maria Laverda

Paola Drigo