

# ANÀLISI GENÈTICA I MOLECULAR DE LES MIGRANYES HEREDITÀRIES

memòria presentada per:  
**Ester Cuenca León**

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

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

BARCELONA

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Dr. Bru Cormand Rifà

Ester Cuenca León



# INTRODUCCIÓ



## INTRODUCCIÓ HISTÒRICA

---

El patiment causat per la migranya s'ha descrit com a mínim durant els últims dos mil anys i no hi ha dubte que al llarg de la història de la humanitat, que comprèn uns 250.000 anys, una proporció considerable de cada generació ha sofert el conjunt de símptomes presents a la síndrome de la migranya. Es manifesta a totes les civilitzacions, i ja és mencionada en els Anals Sumeris (4000aC) o a la mitologia grega. Les característiques més importants de la migranya van ser clarament reconegudes ja el segle II, quan Areteus la va descriure amb el nom d'*heterocrania*. Els termes *heterocrania*, *holocrania* i *hemicrania* es van utilitzar durant segles i finalment va imposar-se *hemicrania*, evolucionant ràpidament al terme *migranya* que utilitzem avui dia. Al segle X, Avicena (Ibn Sina, metge persa) indica que les cefalees no són provocades per un adormiment de les funcions cerebrals, sinó per una 'exaltació' d'aquestes, tot apuntant a l'etiopatogènesi real del trastorn. Durant el segle XVII s'estableixen les bases de la neurologia moderna, i els avenços en el coneixement de la migranya són probablement més decisius que durant els dos segles següents. És en aquesta època quan Willis fa una revisió dels trastorns nerviosos en què inclou la secció 'The cephalalgia', on trobem un gran nombre d'observacions clíniques extraordinàries i especulacions medievals sobre la migranya, l'epilèpsia i d'altres reaccions paroxístmiques. Entre els anys 1863 i 1865, Lieving fa la seva aportació al món de la migranya tot indicant que la varietat de migranyes és enorme i destacant la coexistència de les cefalees migranyoses amb moltes altres reaccions també paroxístmiques. És durant el segle passat quan la migranya és acceptada com a trastorn del sistema neurovascular .

Tot i que els trets principals de la migranya no han canviat en dos mil anys i que tenim la sensació que encara sabem molt poc sobre aquesta patologia, no hi ha dubte que en les últimes quatre dècades hi ha hagut avenços substancials en el seu coneixement que incideixen especialment en el desenvolupament de nous fàrmacs i de noves tècniques per pal·liar el dolor. No obstant, les causes primàries de la migranya i bona part de la seva fisiopatologia resten encara per resoldre. Possiblement una de les troballes més importants que s'han fet en els darrers temps és la descoberta de l'existència d'una component genètica hereditària. La

migranya es pot entendre actualment com l'expressió de les característiques genètiques i de la manera de viure de l'individu, que és l'equivalent a dir que l'expressió d'aquesta malaltia complexa és el resultat de la interacció entre factors genètics i ambientals que incideixen en l'individu.

La migranya és un trastorn fascinant en el sentit que podem ser testimonis de l'alteració sobtada de funcions neurològiques i de l'homeòstasi molt variades, com ara disfàsia, hemiplègia, visió alterada, vertigen, vòmits, trastorns intestinals, trastorns de l'alimentació i trastorns de personalitat, que en minuts o hores es restableixen quan l'individu torna a la normalitat.

Sembla lògic pensar que si avancem en el coneixement de la migranya a nivell genètic i molecular podrem arribar més lluny en el coneixement de la fisiopatologia de la malaltia i tindrem l'oportunitat de desenvolupar teràpies de prevenció i curatives eficaces.

## Capítol 1 Migranya

### 1.1 GENERALITATS

La migranya és un mal de cap primari, episòdic i crònic, molt comú a la població. Es caracteritza per episodis recurrents i incapacitants de cefalea, de naturalesa pulsativa, que acostumen a iniciar-se al voltant de l'ull o al front, i que s'estenen unilateralment en el 60-70% dels pacients. Típicament, la cefalea va acompanyada d'extrema sensibilitat a la llum (fotofòbia) i al soroll (fonofòbia), nàusees, vòmits i agreujament per l'activitat física. Sovint la cefalea va precedida del pròdrom, que consisteix en canvis d'humor, sensibilitat, gana i/o retenció de fluids.

La simptomatologia que acompanya el mal de cap pot tenir molta importància, tanta que el mal de cap mai és el símptoma exclusiu de la migranya, i com veurem en el proper apartat, en algunes variants la cefalea no és ni tan sols un tret obligat de les crisis.

### 1.2 DIAGNÒSTIC

L'assignació dels pacients migranyosos a una categoria és complexa per la inexistència de marcadors biològics indicatius de la malaltia, per l'ampli espectre i la poca especificitat de la simptomatologia clínica, i per l'absència de simptomatologia entre els episodis. La clínica, molt heterogènia, s'ha intentat categoritzar durant molts anys, però les definicions de la migranya han estat subjectives i canviants, la qual cosa no permetia als clínics categoritzar els pacients, ni als investigadors disposar de mostres homogènies. Es feia imprescindible l'establiment d'uns criteris clínics rigorosos de classificació, que poguessin ser utilitzats arreu del món.

L'any 1988, un grup d'experts en la caracterització i diagnòstic de la migranya van constituir la 'International Headache Society' (IHS) que va recollir i publicar uns criteris de diagnòstic consensuats (ICHD-I, 1988). L'establiment d'aquests criteris va ser fonamental per abordar els estudis genètics, que van fer un salt qualitatiu a partir de llavors. L'any 2004, com a fruit del coneixement generat per nous estudis i publicacions, es van revisar els criteris i es va publicar una segona edició (ICHD-II, 2004).

En absència de marcadors clau per al diagnòstic de la migranya, aquest es fa en base a la descripció dels episodis per part del pacient i a l'exclusió d'altres entitats patològiques que podrien ser causants de cefalea com a símptoma. La migranya es classifica segons els criteris

ICHD-II en dos grans grups: migranya sense aura (MO), i migranya amb aura (MA). Hi ha quatre categories més minoritàries: les síndromes periòdiques de la infància (CPS) que sovint son precursors de migranya, migranya retiniana, complicacions de migranya i probable migranya (taula 1).

Taula 1. Classificació de la migranya segons la Societat Internacional de Cefalees (IHS).

## CLASSIFICACIÓ INTERNACIONAL DE LES CEFALEES, IIa edició

### 1. MIGRANYA

- 1.1 MIGRANYA SENSE AURA
- 1.2 MIGRANYA AMB AURA
  - 1.2.1 AURA TÍPICA AMB CEFALEA MIGRANYOSA
  - 1.2.2 AURA TÍPICA AMB CEFALEA NO MIGRANYOSA
  - 1.2.3 AURA TÍPICA SENSE CEFALEA
  - 1.2.4 MIGRANYA HEMIPLÈGICA FAMILIAR
  - 1.2.5 MIGRANYA HEMIPLÈGICA ESPORÀDICA
  - 1.2.6 MIGRANYA DE TIPUS BASILAR
- 1.3 SÍNDROMES PERIÒDIQUES DE LA INFÀNCIA HABITUALMENT PRECURSORES DE MIGRANYA
  - 1.3.1 VÒMITS CÍCLICS
  - 1.3.2 MIGRANYA ABDOMINAL
  - 1.3.3 VERTIGEN PAROXÍSTIC BENIGNE DE LA INFÀNCIA
- 1.4 MIGRANYA RETINIANA
- 1.5 COMPLICACIONS DE MIGRANYA
- 1.6 PROBABLE MIGRANYA

*ICHD-II de la International Headache Society*

#### 1.2.1 MIGRANYA SENSE AURA (MO, ICHD-1.1)

És la variant més comú, representa el 80% de tots els casos de migranya, és la que presenta una freqüència d'episodis més alta i sovint el dolor és més incapacitant que en la MA. Es caracteritza per episodis recurrents de mal de cap d'entre 4 i 72h de durada, amb com a mínim dues de les següents característiques: localització unilateral, qualitat pulsativa, intensitat del dolor de moderada a severa i agreujament per l'activitat física del dia a dia (ex: caminar o pujar escales), i que van acompanyats de fotofòbia i fonofòbia i/o nàusees i/o vòmits (taula 2). Per diagnosticar un individu com a MO, ha d'haver patit al llarg de la seva vida com a mínim 5 episodis que compleixin els criteris mencionats més amunt, que no poden ser atribuïbles a qualsevol altre trastorn.

Taula 2. Criteris de diagnòstic per la migranya sense aura (MO) i la migranya amb aura (MA)

**CLASSIFICACIÓ INTERNACIONAL DE LES CEFALEES, IIa edició****1.1 MIGRANYA SENSE AURA**

- A Com a mínim 5 episodis que compleixin criteris B-D
- B Cefalea d'entre 4 i 72 hores de durada (no tractada o amb tractament ineficaç)
- C Cefalea que presenta com a mínim dues de les següents característiques:
  1. localització unilateral
  2. qualitat pulsativa
  3. intensitat de moderada a greu
  4. condueix a evitar o està agravada per l'activitat física rutinària (p.ex. caminar, pujar escales)
- D Durant el dolor presenta com a mínim un dels següents símptomes:
  1. nàusea i/o vòmit
  2. fotofòbia i fonofòbia
- E No és atribuïble a cap altra causa

**1.2 MIGRANYA AMB AURA**

- A Com a mínim 2 episodis que compleixin el criteri B
- B Aura migranyosa que compleixi els criteris B i C per a un dels subtipus 1.2.1 – 1.2.6
- C No atribuïble a cap altre trastorn

*ICHD-II de la International Headache Society***1.2.2 MIGRANYA AMB AURA (MA, ICHD-1.2)**

Trastorn recurrent caracteritzat per la manifestació d'episodis amb un o més símptomes de disfunció de l'escorça cerebral o del tronc de l'encèfal totalment reversibles, que s'instauren gradualment durant 5-20 minuts, i no duren més de 60 minuts (taula 2). El conjunt d'aquestes manifestacions neurològiques que sovint es presenten abans, i de vegades de forma simultània al mal de cap, rep el nom d'aura. L'aura més comú és la visual, però pot involucrar altres sentits i ocasionalment causar dèficit sensitius, motors o del llenguatge. Haver patit dos episodis d'aura no atribuïbles a cap altre trastorn són suficients per a diagnosticar un individu com a MA. El mal de cap sovint compleix els criteris de MO, però pot no complir-los o fins i tot no ser-hi. Les MA es classifiquen segons les seves característiques en diferents categories (taula 1). Les tres primeres categories (ICHD-1.2.1 a 1.2.3) estan contemplades en la definició de MA i només varien per la presència/absència del mal de cap i la seva naturalesa.



## 1.2.2.1 Migranya hemiplègica familiar (FHM, ICHD-1.2.4)

És una variant severa i poc freqüent (<1% casos de migranya) que es caracteritza perquè els pacients presenten, entre els símptomes de l'aura, debilitat motora o paràlisi d'un hemicòs, completament reversible i perquè tenen, com a mínim, un familiar de primer o segon grau diagnosticat en la mateixa categoria (taula 3). Aquesta variant ha estat de gran interès en l'estudi de la migranya ja que s'hereta de forma mendeliana simple, -de forma autosòmica dominant- i té un tret obligat i determinant per al seu diagnòstic, la debilitat motora, que ha d'ésser clarament perceptible. Cal destacar que a les famílies amb individus amb FHM hi ha sovint individus amb MA i MO i que un mateix individu pot patir episodis de vegades de FHM i de vegades de MA o MO, tot suggerint que hi ha un nexa d'unió entre la variant rara FHM i les formes més comuns de migranya. La FHM ha estat, per aquesta raó, un model útil d'estudi de les formes comuns de migranya.

Taula 3. Criteris de diagnòstic per la migranya hemiplègica familiar (FHM)

### CLASSIFICACIÓ INTERNACIONAL DE LES CEFALEES, IIa edició

#### 1.2.4 MIGRANYA HEMIPLÈGICA FAMILIAR

- A Com a mínim 2 episodis que compleixin criteris B-C
- B Aura caracteritzada per dèficit motor completament reversible i com a mínim un dels següents símptomes:
  1. símptomes visuals totalment reversibles incloent fenòmens positius (llumetes, punts, línies) i/o negatius (pèrdua de visió)
  2. símptomes sensitius totalment reversibles, positius (formigueig, parestèsia) i/o negatius (hipoestèsia)
  3. trastorn del llenguatge totalment reversible
- C Com a mínim presenta dues de les següents característiques:
  1. un dels símptomes de l'aura progressa durant 5 o més minuts i/o diferents símptomes de l'aura es donen en successió de 5 o més minuts.
  2. cada símptoma dura entre 5 minuts i 24 hores.
  3. una cefalea que compleix els criteris B-D per MO (1.1) comença durant o en els següents 60 minuts.
- D Hi ha com a mínim un familiar de primer o segon grau diagnosticat FHM (1.2.4)
- E No és atribuïble a cap altra causa

## 1.2.2.2 Migranya hemiplègica esporàdica (SHM, ICHD-1.2.5)

Aquesta categoria és idèntica quant a simptomatologia a la FHM, i només es diferencia de l'anterior per l'absència de familiars de primer o segon grau afectats dins la mateixa categoria de migranya que el proband.

### 1.2.2.3 Migranya de tipus basilar (BM, ICHD-1.2.6)

Pertanyen a aquesta categoria els individus amb aura clarament originada al tronc de l'encèfal i/o amb afectació simultània dels dos hemisferis cerebrals, però sense debilitat motora. Aquests símptomes inclouen: disàrtria, vertigen, tinnitus, hipoacúsia, diplòpia, símptomes visuals simultanis en el camp temporal i nasal dels dos ulls, atàxia, alteracions en el nivell de consciència i parestèsies bilaterals simultànies. Alguns d'aquests símptomes aïllats podrien confondre el diagnòstic, ja que també poden ser el reflex de situacions d'ansietat i hiperventilació. També és habitual que els individus amb FHM o SHM presentin símptomes de tipus basilar, però sempre que hi ha debilitat motora els individus s'han de diagnosticar com a migranya hemiplègica (HM).

### 1.2.3 SÍNDROMES PERIÒDIQUES DE LA INFÀNCIA (CPS, ICHD-1.3)

Les manifestacions migranyoses en els individus de curta edat són diferents a les dels adults, i els pocs estudis longitudinals que s'han fet ho posen de manifest. Calia generar una categoria com aquesta o establir uns criteris adaptats als infants per poder detectar el més aviat possible les manifestacions de la malaltia. Aquest grup categòric va prenent importància a mesura que els clínics en tenen coneixement i paren atenció a detectar els símptomes. Sovint els pares dels pacients recorden fases infantils o juvenils amb un altre tipus de simptomatologia paroxística i recurrent, o els avis ho expliquen dels fills en ser testimonis de les mateixes manifestacions en els néts. La ICHD-II inclou tres tipus de CPS: vertigen paroxístic benigne infantil, vòmits cíclics i migranya abdominal (taula 4).

### 1.2.4 MIGRANYA RETINIANA (ICHD-1.4)

Contempla episodis d'alteració visual monocular.

### 1.2.5 COMPLICACIONS DE MIGRANYA (ICHD-1.5)

Són migranyes molt incapacitants, ja sigui per la seva freqüència (>15 dies al mes durant un mínim de 3 mesos), durada (>72h/episodi) o gravetat (algun símptoma de l'aura té una durada de més de 60 minuts i fins a una setmana, o s'associa a una lesió isquèmica del cervell detectable amb neuroimatge, o a una crisi epilèptica).

### 1.2.6 PROBABLE MIGRANYA (ICHD-1.6)

Episodis de tipus migranyós que no compleixen tots els criteris requerits per ser diagnosticats com a tals.

Taula 4. Criteris diagnòstics per les síndromes periòdiques infantils reconegudes com a precursors de migranya.

<b>CLASSIFICACIÓ INTERNACIONAL DE LES CEFALEES, IIa edició</b>	
<b>1.3</b>	<b>SÍNDROMES PERIÒDIQUES DE LA INFÀNCIA RECONEGUDES COM A PRECURSORS DE MIGRANYA</b>
<b>1.3.1</b>	<b>VÒMIT CÍCLIC</b>
A	Com a mínim 5 crisis que compleixin els criteris B i C
B	Crisis episòdiques, estereotipades en cada pacient, de nàusees intenses i vòmits que duren des d'una hora fins a 5 dies.
C	Els vòmits durant les crisis ocorren 4 cops per hora, com a mínim durant una hora.
D	Lliures de símptomes entre crisis.
E	No atribuïble a cap altre trastorn.
<b>1.3.2</b>	<b>MIGRANYA ABDOMINAL</b>
A	Com a mínim 5 crisis que compleixen els criteris B - D
B	Crisis de dolor abdominal que duren entre 1 i 72 hores.
C	El dolor abdominal té les següents característiques: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. localització a la línia mitja, periumbilical o pobrament localitzat</li> <li>2. qualitat sorda</li> <li>3. intensitat de moderada a severa</li> </ol>
D	Durant el dolor abdominal com a mínim 2 de les següents característiques: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. anorèxia; 2. nàusees; 3. vòmits; 4. pal·lidesa</li> </ol>
E	No atribuïble a cap altre trastorn.
<b>1.3.3</b>	<b>VERTÍGEN PAROXÍSTIC BENIGNE DE LA INFÀNCIA</b>
A	Com a mínim 5 crisis que compleixen el criteris B
B	Múltiples episodis de vertigen que ocorren sense avís previ i es resolen espontàniament en minuts o hores.
C	Exàmen neurològic normal, així com funció auditiva i vestibul·lar entre les crisis.
D	Encefalograma normal

*ICHD-II de la International Headache Society*

### 1.3 CLÍNICA

L'edat d'inici de la migranya se situa entre els 10 i els 40 anys de vida (Silberstein S, 1998). Encara que un 25% dels pacients presenten un mínim de 2 episodis/mes, la freqüència mitjana és d'un episodi mensual (Launer et al., 1999). Un episodi de migranya pot tenir fins a quatre fases. Un terç dels pacients inicien l'episodi amb símptomes d'astènia, badalls, rigidesa de nuca, canvis d'humor, manca de concentració, símptomes gastrointestinals i pal·lidesa (Kelman, 2004), és la fase del **pròdrom**, o conjunt de símptomes premonitoris de l'episodi de cefalea que arribarà entre les 2 i les 72 hores següents. La durada d'aquests símptomes premonitoris no s'inclou en la durada de l'episodi de migranya. El 33% dels pacients migranyosos presenten episodis que avancen cap a la fase d'**aura** expressant símptomes de disfunció de l'escorça cerebral o del tronc de l'encèfal que s'instauren uns minuts abans o alhora que la cefalea i són de curta durada (<60 minuts). En el 99% dels pacients amb aura les disfuncions es tradueixen en alteracions visuals (escotomes, línies en ziga-zaga), però també es donen alteracions sensorials (31% dels pacients), alteracions del llenguatge (18%) i alteracions motores (<6%) (Russell i Olesen, 1996). La tercera fase de l'episodi, la més comú i debilitant, és la **cefalea** unilateral, pulsativa, intensa quant al dolor i que empitjora amb el moviment. Els símptomes més típics que l'acompanyen son nàusees, vòmits, fotofòbia i fonofòbia (IHS, 2004). En la fase final o **resolutòria** de l'episodi la majoria de pacients acostumen a sentir-se esgotats, encara que hi ha pacients que se senten frescos o fins i tot eufòrics .

La pèrdua de força o paràlisi unilateral que presenten el 6% dels pacients migranyosos (aura motora) va gairebé sempre precedida d'altres símptomes d'aura (Thomsen et al., 2002). Alguns pacients amb FHM presenten ocasionalment nivells de consciència alterat (des de confusió a coma), febre, hemiplègia prolongada o crisis epilèptiques. El 20% dels pacients amb FHM presenten atàxia cerebel·losa o nistagmus de forma permanent (Ducros et al., 2001). L'edat típica d'inici dels episodis en pacients amb FHM se situa entre els 10 i els 15 anys (Ducros et al., 2001).

### 1.4 EPIDEMIOLOGIA

Se sap que la distribució de la migranya a la població varia en funció del sexe, l'edat i l'ètnia. S'han fet estudis epidemiològics, però tal com passa amb altres malalties complexes, és difícil obtenir resultats fiables, tant per la dificultat del diagnòstic a partir del testimoni del pacient,

com perquè gran part dels pacients mai han visitat un metge, i els que ho fan són els que presenten les formes més freqüents i/o més severes de la malaltia.

### 1.4.1 PREVALENÇA

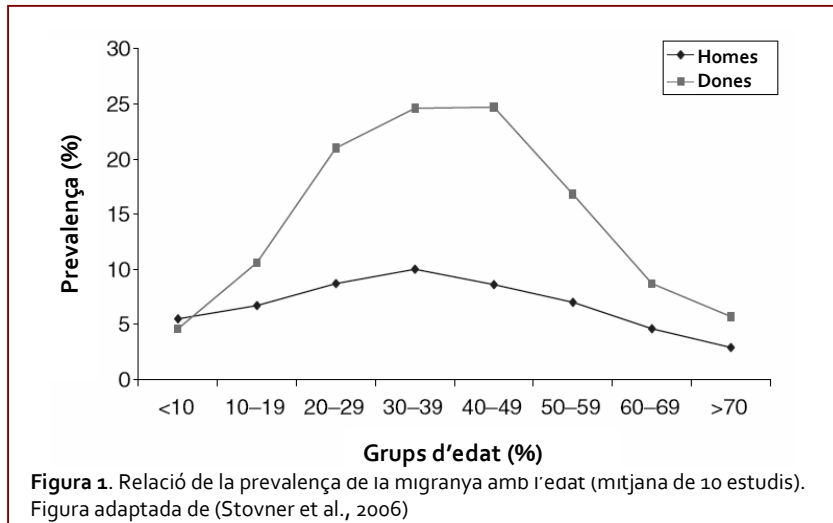
Els estudis estimen que la **prevalença** a la població occidental és del 15 al 25% en dones i del 6 al 8% en homes (Pietrobon i Striessnig, 2003), mentre que a l'Àfrica o a l'Àsia és molt inferior, al voltant del 5-6%, possiblement a causa de diferents susceptibilitats genètiques entre poblacions, a estils de vida diferents i a efectes de l'ambient (Dent et al., 2004; Takeshima et al., 2004).

#### 1.4.1.1 Distribució per sexes

La prevalença de la migranya és lleugerament més alta en nens que en nenes fins a la pubertat, i a partir de llavors la relació s'inverteix i als 12 anys ja podem observar una clara preponderància en noies (Abu-Arefeh i Russell, 1994). A l'edat de 20 anys la relació dona-home és 2:1 i el desequilibri entre sexes és màxim al voltant dels 40 anys, quan la relació és de 3:1. La prevalença augmenta amb l'edat en ambdós sexes fins arribar a un màxim al voltant dels 35 anys en els homes i dels 45 anys a les dones. La disminució, encara que més accentuada a les dones manté la prevalença més alta que la dels homes fins i tot després de la menopausa (Breslau i Rasmussen, 2001; Stovner et al., 2006) (figura 1). La preponderància de la migranya en dones des de la pubertat podria ser conseqüència de la fluctuació d'hormones femenines durant el cicle menstrual, i el detonant de les crisis migranyoses podria ser una caiguda en la concentració d'estrògens (Boussier, 2004; MacGregor, 2004). En conseqüència, embaràs, contraceptius orals, teràpies hormonals i menopausa podrien interferir en l'aparició dels episodis migranyosos.

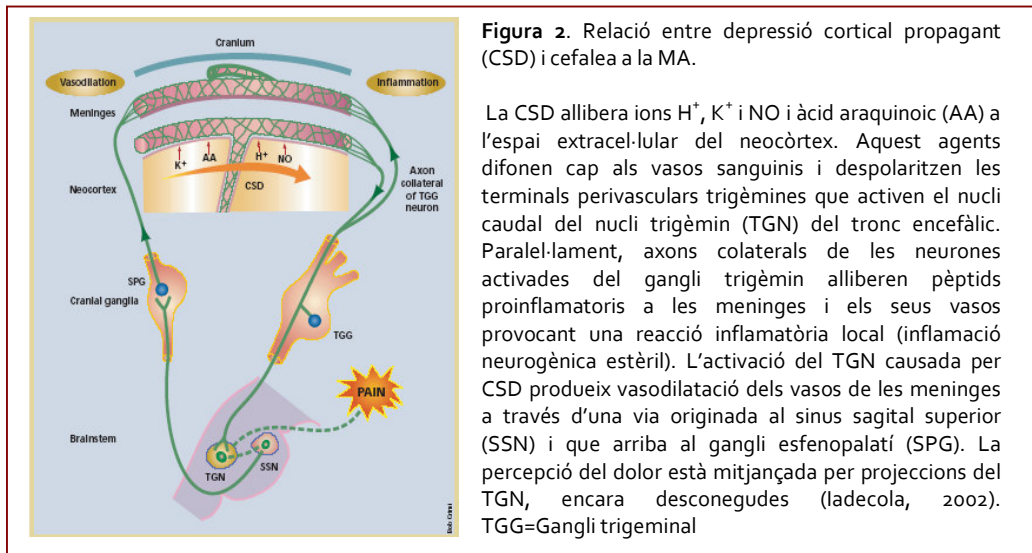
#### 1.4.1.2 Distribució per categories

Pel que fa a la distribució per categories subdiagnòstiques de la migranya, els estudis epidemiològics són molt escassos, però s'ha estimat que la prevalença de MO seria del 12,5% (15,5% dones – 7,5% homes) i la de MA del 5% (7% dones – 3% homes) (Russell et al., 1995b). Donada la importància de la categoria FHM per a l'estudi de les migranyes, s'ha calculat la seva prevalença de forma independent, que s'estima en un 0,01% (Thomsen et al., 2002).

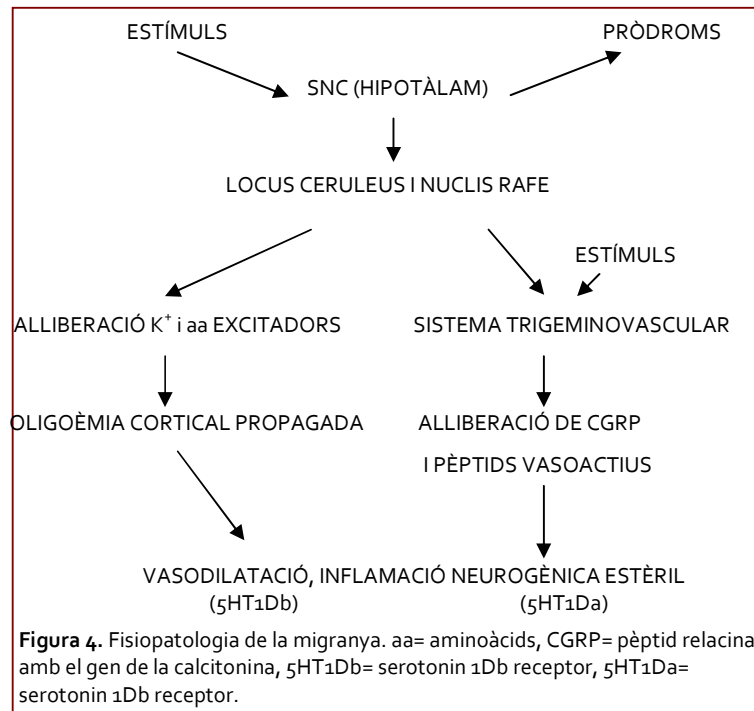


**1.5 FISIOPATOLOGIA**

La fisiopatologia de la migranya és encara poc coneguda, i no hi ha una teoria simple que permeti explicar tots els fenòmens que s'esdevenen en un atac migranyós. Durant anys s'ha postulat una teoria vascular, que suggeria que el mal de cap seria causat per una vasodilatació, mentre que l'aura seria el resultat d'una vasoconstricció (Wolff, 1963), però es va demostrar que el mal de cap comença abans que el flux sanguini cerebral hagi pujat a nivells 'anormals' (Olesen et al., 1990). Actualment es pensa que una disfunció neuronal condueix a una seqüència de canvis intra- i extracranials, probablement via depressió (despolarització) propagant de l'activitat neuronal cortical, tot provocant la migranya que inclou pròdrom, aura i mal de cap. La vasodilatació jugaria un paper important en el mal de cap greu, però probablement es tractaria d'un epifenomen, resultat de la inestabilitat en el mecanisme de control neurovascular central (figura 2; Iadecola, 2002).







### 1.5.1 ESTAT INTERICTAL DEL CERVELL

En els últims anys s'han observat **diferències en el processament de la informació cortical** entre el cervell d'un individu migranyós en repòs (entre episodis) i el d'un individu control. Els cervells d'individus normals, sota la repetició d'un estímul presenten habituació, és a dir, una disminució de la resposta cortical evocada. Els individus migranyosos, en canvi, presenten el fenomen d'habitució reduït, o fins i tot activació (Ambrosini i Schoenen, 2003), que podria contribuir a la hipersensibilitat a certs estímuls sensorials com llums intenses o olors fortes. La hipòtesi més acceptada pel dèficit en l'habitució és que sigui conseqüència d'hiperexcitabilitat, ja sigui per disminució de la inhibició cortical o per increment de l'excitabilitat (Welch et al., 1990).

### 1.5.2 AURA

L'any 1941 Lashley (Lashley, 1941) descriu les característiques d'una aura visual típica, fenomen que encaixava amb la depressió cortical propagant (CSD) observada poc després per Leao (Leao, 1944) en animals. La CSD és una onada de despolarització lenta (3-5mm/minut) de les cèl·lules glials i neuronals que s'estén pel còrtex i encapçala una supressió de llarga durada de l'activitat i provoca canvis iònics en l'homeòstasi (Lauritzen, 1994). Les noves tècniques d'imatge corroboren la hipòtesi que l'aura és el resultat d'un fenomen electrofisiològic i que els fenòmens vasculars es desenvolupen com a conseqüència d'aquestes



fluctuacions en l'activitat neuronal (Cutrer et al., 1998; Cao et al., 1999; Bowyer et al., 2001; Hadjikhani et al., 2001).

### 1.5.3 CEFALEA

Les meninges, les membranes que protegeixen el sistema nerviós central, són les úniques parts del cervell sensibles al dolor. Estan irrigades per vasos molt ben innervats per les fibres del nervi trigemin, que és el mecanisme d'alerta i defensa del teixit cerebral. Es podria dir que el mal de cap és la conseqüència de l'activació d'aquest sistema de defensa (Moskowitz i Macfarlane, 1993). Les neurones trigèmines son bipolars, tenen el cos cel·lular en el gangli trigemin i el seu axó estableix connexions sinàptiques amb el nucli caudal del trigemin situat al tronc de l'encèfal, i amb els vasos cerebrals del neocòrtex i les meninges (figura 2). Aquestes fibres poden activar-se per alteracions primàries del cervell, o per altres alteracions que es donen a nivell de la circulació i a l'interior de les parets dels vasos sanguinis. Els axons del trigemin contenen pèptids vasoactius: substància P, pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP), i neuroquinina A. En models animals d'experimentació, l'alliberament de mediadors inflamatoris per part del nervi trigemin inicia una reacció inflamatòria anomenada 'inflamació neurogènica', caracteritzada per la vasodilatació i la fuga de proteïnes plasmàtiques a la *dura mater* (Markowitz et al., 1987; Moskowitz i Macfarlane, 1993). El mal de cap migranyós podria ser conseqüència de l'activació de les neurones trigèmines i la subseqüent reacció inflamatòria de les meninges. Els aferents trigèmins activats esdevenen més sensibles i comencen a respondre a estímuls mecànics normalment innocus. Això explicaria com la palpitació dels vasos sanguinis produeix el mal de cap pulsatiu i perquè les activitats que augmenten la pressió intracranial com tossir, ajupir-se, i l'activitat física en general, poden augmentar la sensació de dolor (Strassman et al., 1996). A més, les neurones activades del trigemin també transmeten el senyal al nucli caudal del tronc de l'encèfal i activen altres estructures del cervell implicades en el procés del dolor. D'altra banda, l'activitat antinociceptiva continuada i la conseqüent disminució de la inhibició, pot tornar hiperexcitable el sistema trigèminovascular (Knight i Goadsby, 2001).

### 1.5.4 SENSIBILITZACIÓ CENTRAL

Burstein i col·laboradors (Burstein et al., 2000) van demostrar en el model de rata de dolor intracranial, que després de l'estimulació química de les neurones perifèriques del trigemin, les neurones trigèmines centrals també se sensibilitzaven i començaven a respondre a estímuls abans innocus. Això podria explicar l'associació de migranya a l'al·lodínia cutània (dolor en resposta a estímuls no nocius com calor, fred i pressió sobre la pell). Del 53 al 79%

dels pacients desenvolupen al·lodínia, i aquests acostumen a tenir una història de migranya més llarga i episodis més freqüents que els no al·lodínics (Burstein et al., 2000).

### 1.5.5 CONNEXIÓ ENTRE L'AURA I LA CEFALEA

Bolay i col·laboradors (Bolay et al., 2002) han establert una connexió fisiopatològica entre l'aura de migranya i la cefalea. Han demostrat que en rata l'inici de la CSD activa aferents del trigemin i condueix a una sèrie de reaccions a nivell de meninges i de tronc de l'encèfal, que genera el mal de cap. Entre les reaccions hi ha vasodilatació de les meninges i extravasació de proteïnes a la *dura mater*. A més, s'ha trobat expressió d'un marcador d'activitat neuronal (c-fos) al nucli caudal trigemin, regió del tronc de l'encèfal involucrada en el processament de la informació nociceptiva. L'activació del trigemin podria donar-se com a conseqüència dels canvis en la composició del fluid extracel·lular induïts per la -CSD, com ara l'increment en les concentracions de  $K^+$ ,  $H^+$ , neurotransmissors, i metabòlits (Bolay et al., 2002). També s'ha demostrat que la CSD indueix canvis en l'expressió gènica de pèptids vasoactius i canals de calci de tipus L (Choudhuri et al., 2002) (figura 2).

En contra de totes aquestes evidències de relació causal entre l'aura i la cefalea en l'episodi migranyós, hi ha el fet que la majoria de pacients migranyosos no tenen aura (MO), però s'ha postulat que la CSD podria estar produint-se en àrees clínicament silencioses del còrtex cerebral (Woods et al., 1994; Cao et al., 1999).

## 1.6 TRACTAMENT

El tractament actual de la migranya és bàsicament simptomàtic. Hi ha dos tipus principals de tractament: el que s'ocupa de la **fase aguda**, que té com a objectiu disminuir la durada i severitat de l'episodi, i el **profilàctic**, que té com a objectiu disminuir la freqüència i severitat dels episodis.

### 1.6.1 PROFILAXI

És bàsic identificar els factors desencadenants de l'episodi de cada individu (cafeïna, greixos, estrès, sedentarisme, excés de llum, calor) i evitar-los (dieta, tècniques de relaxació, exercici). El tractament farmacològic preventiu es basa en l'eficàcia del fàrmac, possibles efectes adversos, dosi i preferència per part del pacient. Hi ha profilaxis de curta durada que s'apliquen quan el factor desencadenant és conegut i s'ha estat exposat (ex: menstruació) i profilaxis cròniques que s'apliquen quan el factor desencadenant és desconegut o l'exposició és contínua. La medicació profilàctica inclou neuroestabilitzadors, antidepressius, beta-

bloquejants, bloquejants dels canals de calci, antiinflamatoris no esteroidals (AINEs) i antagonistes serotoninèrgics.

Els **neuroestabilitzadors** disminueixen la freqüència dels episodis en un 50% (Chronicle i Mulleners, 2004). El mecanisme exacte pel qual provoquen aquesta millora és encara desconegut. Els anticonvulsius, com el topiramat o el valproat, funcionen a dosis molt més baixes que les utilitzades per a altres condicions (Kaniecki R, 2004) però poden presentar efectes secundaris importants i a més són potents teratògens. La gabapentina i la pregabalina interaccionen directament amb el canal de calci, són més segures i també han demostrat ser eficaces.

Els **antidepressius** tricíclics (TCAs) inhibeixen la recaptació de noradrenalina i serotonina, atenuant la funció dels receptors de serotonina centrals i beta-adrenèrgics que modulen el dolor. Tant els TCAs (ex: amitriptilina) com els antagonistes de la serotonina (ex: pizotifen) són efectius en la reducció de la severitat dels episodis (Kaniecki R, 2004).

Els **beta-bloquejants** són els més utilitzats en la profilaxi crònica de la migranya. Són efectius en un 60-80% disminuint la freqüència dels episodis a menys de la meitat i els efectes adversos es toleren bé, causant poques pauses en la medicació (ex: propranolol i timolol). Les proves a favor de l'efectivitat dels **bloquejants dels canals de calci**, com la flunaricina en pediatria i el verapamil i el nimodipine en adults, són menys convincents que les dels anticonvulsius, antidepressius i beta-bloquejants (Snow et al., 2002). El mecanisme d'acció és a través de la modulació de neurotransmissors i citoprotecció mitjançant la prevenció de la hipòxia i l'entrada de ions calci a l'interior cel·lular (Pryse-Phillips et al., 1997). És una medicació ben tolerada i amb pocs efectes adversos.

Els **AINEs** s'utilitzen en la profilaxi de curta durada, essent el naproxè el més eficaç, especialment en la prevenció d'episodis de migranya perimenstruals. Es pensa que actua inhibint l'acció de la ciclooxigenasa i l'acció i biosíntesi de les prostaglandines. Els efectes secundaris inclouen molèsties gastrointestinals. **Altres tractaments profilàctics** encara en estudi són la toxina botulínica A, hormones com l'estradiol, la progestina o els contraceptius que contenen estrògens.

### 1.6.2 EPISODI AGUT

El tractament de l'episodi agut té per objectiu tractar els símptomes de forma ràpida i consistent, evitant la recurrència per restablir la normalitat en l'individu. Es poden administrar dues medicacions, la principal i una segona a utilitzar si la principal falla. Es considera acceptable un tractament per l'episodi agut d'un a dos dies per setmana. Per sobre d'aquesta freqüència s'indica un tractament preventiu. Les medicacions efectives per a la crisi són els AINEs, la dihidroergotamina (DHE), els triptans, i combinacions (aspirina, acetaminofen, cafeïna). En casos molt greus es poden arribar a administrar opioids, corticoesteroides o DHE intravenós.

**Els AINEs** són la primera línia en la teràpia dels episodis aguts de migranya (ex: aspirina, ibuprofè, naproxè, acetaminofen). Els **TRIPTANS** són agonistes dels receptors específics 5-hidroxitriptamina (5-HT<sub>1B/1D</sub>). La seva eficàcia ve donada pels efectes vasoconstrictor cranial, inhibidor de la inflamació neurogènica i inhibidor de l'excitabilitat de les neurones trigemino-vasculars a través de l'estimulació de receptors a nivell del tronc de l'encèfal (Ferrari, 1998). Són efectius si s'administren a l'inici de l'episodi migranyós, raó per la qual Levy i col·laboradors (Levy et al., 2004) suggereixen, basant-se en la seva experiència en animals, que el mecanisme d'acció dels triptans consisteix a bloquejar la transmissió sinàptica entre les neurones trigemino-vasculars centrals i el sistema perifèric. Els triptans també estan implicats en l'activació de les vies descendents antinociceptives (Bartsch et al., 2004). El mecanisme d'acció de l'**ergotamina** i la **dihidroergotamina** és a través d'efectes agonístics no selectius al receptor 5-HT<sub>1</sub>; són fàrmacs amb múltiples efectes adversos. L'**isometeptè** i **productes combinats amb isometeptè** són efectius en episodis lleus. També s'utilitzen **hipnòtics barbitúrics** com el butalbital i **analgèsics opioids** que són molt eficaços en la reversió del dolor d'episodis aguts. La creació de dependència fa que aquests estiguin reservats a pacients en què els agents de primera línia són inefectius o estan contraindicats. El butorfanol en esprai nasal és el més eficient d'aquesta barreja d'agonistes i antagonistes opioids.

## 1.7 LA CÀRREGA DE LA MALALTIA

### 1.7.1 IMPACTE SOCIOECONÒMIC

La migranya constitueix un enorme problema de salut pública, tant a nivell de l'individu com a nivell de la societat. Per això ha estat classificada per la OMS com la dinovena malaltia que causa més incapacitació al llarg de la vida d'un individu (2001). La majoria dels episodis migranyosos són extremadament dolorosos i incapacitants, i afecten durament la vida social i laboral dels malalts. La reducció d'eficiència i/o absentisme laboral, a part de grans pèrdues

econòmiques, pot portar a acomiadaments (no oblidem que l'estrès és un factor desencadenant i per tant els pacients demanen baixes en els moments més crítics). No es tracta només d'un problema sanitari, que també ho és, ni d'un símptoma que en moltes ocasions pot resoldre's amb fàrmacs, que també són efectius en certes ocasions, sinó que hi ha factors psicosocials i relacionats amb la conducta pròpia del pacient que juguen un paper important.

Constitueix també un problema freqüent en la infància i l'adolescència (educació, absentisme escolar), ja que l'impacte sobre el malalt i la seva família pot arribar a alterar la conducta i afegir problemes en el procés d'aprenentatge propi d'aquestes edats, amb pèrdua de relacions socials i aparició de quadres depressius.

S'estima que a la població espanyola hi ha al voltant de 3,6 milions d'individus migranyosos, el 92,5% dels quals estan en període laboral, cosa que suposa una pèrdua econòmica calculada en més de mil milions d'euros anuals, entre pèrdues directes i despeses en sanitat (Badia et al., 2004).

## 1.7.2 TRASTORNS FREQUËNTMENT ASSOCIATS A MIGRANYA

La migranya sovint coexisteix amb d'altres malalties. Les malalties coexistents poden complicar la diagnosi i el tractament, però també poden fer avançar en el coneixement de la patogènesi de la migranya. L'associació podria ser un reflex de que les dues malalties comparteixen factors de predisposició, ja siguin genètics o ambientals, cosa que podria facilitar la selecció de *loci* candidats si els trastorns comòrbids han estat prèviament estudiats a nivell genètic.

Les malalties que es troben associades a la migranya amb més freqüència son:

- trastorns neurològics (epilèpsia, accident vascular cerebral, atàxia)
- trastorns psiquiàtrics (depressió, trastorn bipolar, trastorns d'ansietat)
- trastorns del sistema immunitari (asma, al·lèrgies)

Potser la més interessant és l'associació amb l'epilèpsia perquè s'ha especulat que sota una situació d'hiperexcitabilitat neuronal, el pacient té un risc incrementat de patir una de les dues patologies (De Simone et al., 2007). Les associacions entre migranya i atàxia (Vincent i Hadjikhani, 2007) i entre migranya i accident vascular cerebral també són evidents, aquesta última especialment en dones joves amb fenotip MA (Tzourio et al., 1993; Tzourio et al., 1995; Chang et al., 1999; Etminan et al., 2005).

## Capítol 2 Canals i canalopaties

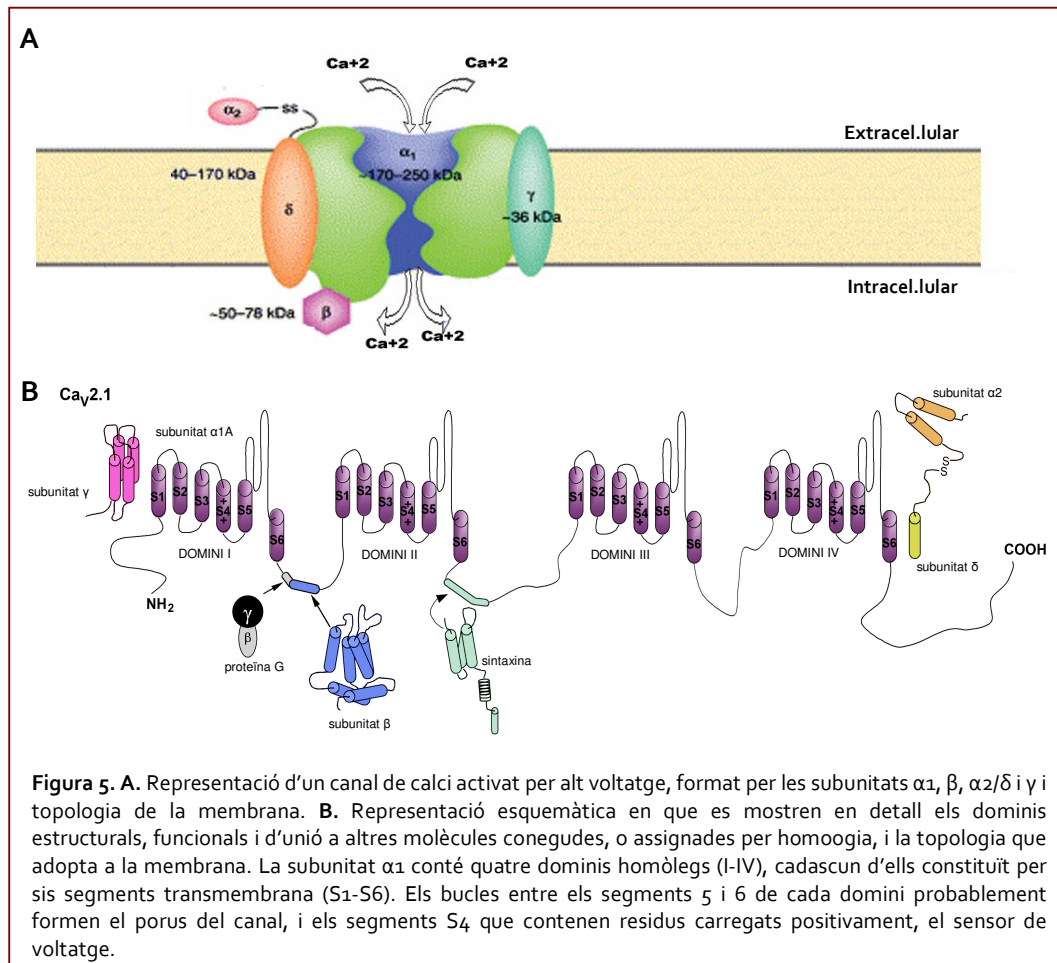
Les migranyes hereditàries es consideren canalopaties en base a la seva naturalesa episòdica i al fet que els diversos gens causants identificats fins ara codifiquen proteïnes implicades en el transport d'ions a través de la membrana de cèl·lules excitable. És per això que es dedica aquest capítol a la descripció dels canals i a les canalopaties, amb l'objectiu d'aprofundir en l'etiologia d'aquest trastorn.

### 2.1 BOMBES I CANALS IÒNICS I EL SEU PAPER EN LA SENYALITZACIÓ NEURONAL

Els canals iònics són proteïnes de membrana formadores de porus a través de les quals es produeix la difusió passiva d'ions específics a favor d'un gradient electroquímic i a gran velocitat ( $\sim 10^7$  ions/segon) (Ackerman i Clapham, 1997). Són responsables de la permeabilitat selectiva de les membranes cel·lulars als ions bàsics per a que les cèl·lules excitable puguin dur a terme la seva funció, encara que també es troben en cèl·lules no excitable. Típicament, els canals iònics són altament selectius per a un tipus d'ió, i en base a aquesta selectivitat es classifiquen en canals de potassi ( $K^+$ ), sodi ( $Na^+$ ), calci ( $Ca^{2+}$ ), clorur ( $Cl^-$ ), i canals catiónics inespecífics (Hubner i Jentsch, 2002). Els canals iònics s'obren i es tanquen de forma molt regulada mitjançant un procés d'activació. Segons el mecanisme d'activació, els canals s'agrupen en canals activats per canvis en el potencial de membrana (activats per voltatge), per la unió a lligands intra- o extracel·lulars (activats per lligand), i per estímuls físics (canals sensibles a la calor o activats per l'estirament o l'inflament) (Hubner i Jentsch, 2002).

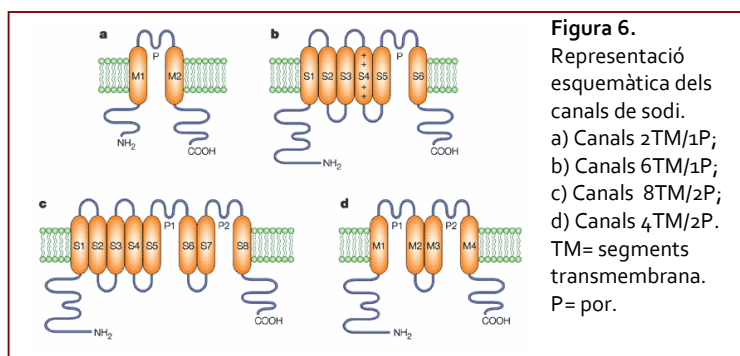
La majoria de membres de la superfamília de canals activats per voltatge comparteixen una estructura molecular comú. Les subunitats  $\alpha_1$  formadores de porus dels canals de  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  contenen quatre dominis de sis segments transmembrana hidrofòbics (S1-S6) i dominis N- i C-terminals intracel·lulars (figura 5). Els canals de  $K^+$  constitueixen la categoria més gran i diversa dels canals activats per voltatge. La majoria dels canals de  $K^+$  travessen la membrana només sis vegades (6TM), com un sol dels quatre dominis hidrofòbics que formen la subunitat  $\alpha$  dels canals de calci. Tanmateix, alguns canals de  $K^+$ , com els que capten  $K^+$  per rectificar el potencial de membrana, consten de només dos segments transmembrana (2TM), imitant les regions S5 i S6 d'altres canals (Armstrong i Hille, 1998). També hi ha canals formats per dues repeticions de subunitats 2TM i canals híbrids formats per una subunitat 2TM i una 6TM. Aquests canals probablement dimeritzen per formar un canal funcional (figura 6). És probable que els canals anàlegs 2TM siguin el punt de partida per l'evolució de la superfamília de canals iònics activats per voltatge, ja que també es troben en procariotes (Armstrong i Hille, 1998).

Les bombes iòniques fan la tasca essencial de generar i mantenir gradients de concentració mitjançant el transport actiu d'ions específics en contra dels seus gradients electroquímics.

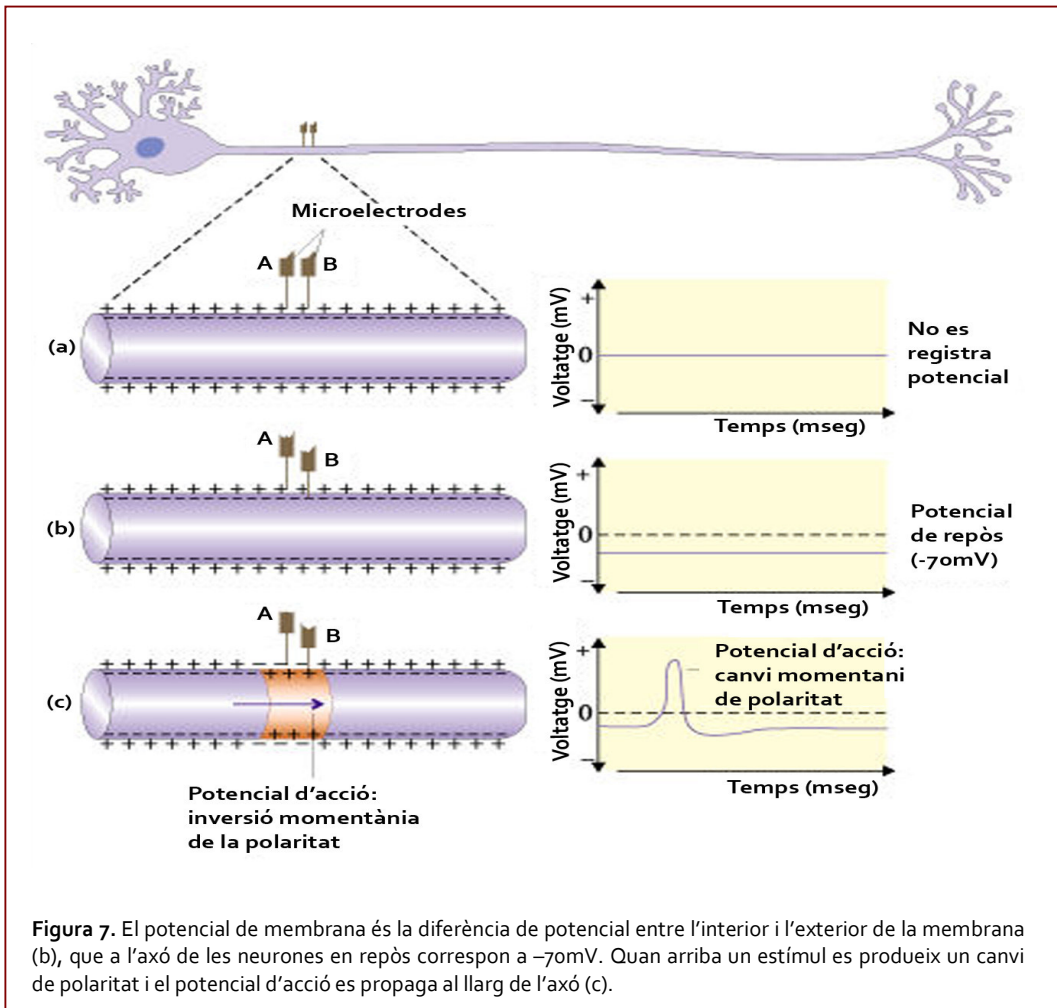


**Figura 5.** A. Representació d'un canal de calci activat per alt voltatge, format per les subunitats  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  i  $\gamma$  i topologia de la membrana. B. Representació esquemàtica en que es mostren en detall els dominis estructurals, funcionals i d'unió a altres molècules conegudes, o assignades per homologia, i la topologia que adopta a la membrana. La subunitat  $\alpha_1$  conté quatre dominis homòlegs (I-IV), cadascun d'ells constituït per sis segments transmembrana (S1-S6). Els bucles entre els segments 5 i 6 de cada domini probablement formen el porus del canal, i els segments S4 que contenen residus carregats positivament, el sensor de voltatge.

Les bombes poden utilitzar els gradients electroquímics d'altres ions (bescanviadors iònics/*antiporters*) o bé adquirir l'energia directament de la hidròlisi d'adenosina-trifosfat (ATP) (bomba ATPasa) (Purves D, 1997). Les ATPases de Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> que hi ha a les membranes plasmàtiques de totes les cèl·lules animals són un exemple clàssic d'aquestes bombes iòniques. Transporten tres ions de Na<sup>+</sup> cap a l'exterior de la cèl·lula i dos ions de K<sup>+</sup> cap a l'interior per cada molècula d'ATP hidrolitzada.



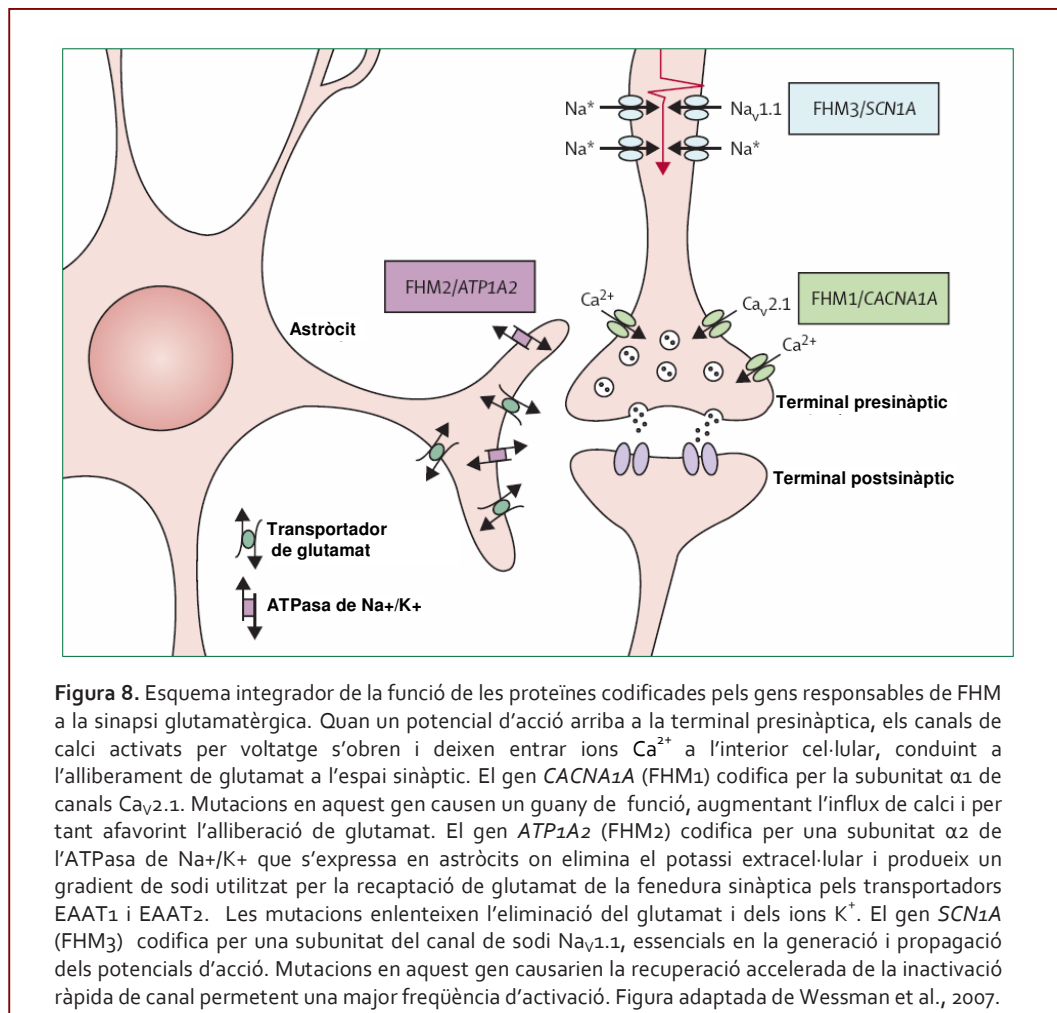
En neurones, així com a totes les altres cèl·lules animals, el potencial elèctric transmembrana depèn de dos factors: 1) permeabilitat de la membrana selectiva per a certs ions, que depèn en bona mesura dels canals iònics, i 2) diferències de concentració iònica a través de les membranes cel·lulars creades per les bombes iòniques que consumeixen energia. Les concentracions intracel·lulars dels ions  $K^+$  i  $Na^+$  en neurones de mamífers són  $140mM (K^+)$  i entre  $5$  i  $15 mM (Na^+)$  mentre que les concentracions extracel·lulars són  $5mM (K^+)$  i  $145 mM (Na^+)$ . Hi ha certs canals de  $K^+$  que estan oberts a les cèl·lules en repòs tot permetent la sortida de potassi a favor de gradient, essent els principals responsables del manteniment del potencial de membrana de repòs, de  $-40$  a  $-90mV$  en el cas de les neurones (Purves D, 1997). Això significa que en estat de repòs hi ha un predomini de càrregues negatives a l'interior de la cèl·lula respecte a l'exterior (figura 7).



Les neurones envien informació a grans distàncies mitjançant els potencials d'acció. Quan la membrana d'una neurona es despolaritza (és a dir, quan es redueix la diferència de potencial transmembrana per l'entrada de ions  $Na^+$ ) i s'arriba a un determinat llindar, es desencadena



un potencial d'acció. L'estímul obre els canals de  $\text{Na}^+$  activats per voltatge, la qual cosa condueix a una afluença curta d'ions  $\text{Na}^+$  i després a una despolarització i propagació d'un potencial d'acció. Una activació més lenta de canals de  $\text{K}^+$  activats per voltatge porta a una sortida d'ions de  $\text{K}^+$  i a la subsegüent restauració del potencial de repòs. Quan un potencial d'acció arriba a una sinapsi, els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  activats per voltatge s'obren i entra  $\text{Ca}^{2+}$  a l'interior de la cèl·lula. L'augment de la concentració interna de  $\text{Ca}^{2+}$  promou la fusió de les vesícules sinàptiques plenes de neurotransmissors amb la membrana presinàptica. Els neurotransmissors alliberats difonen per la fenedura sinàptica, s'uneixen a receptors de la membrana plasmàtica de la neurona postsinàptica, i activen receptors i canals iònics activats per lligand (transmissió sinàptica ràpida) i altres proteïnes reguladores (transmissió sinàptica lenta) (figura 8).



## 2.2 CANALS DE $Ca^{2+}$ ACTIVATS PER VOLTATGE

A les cèl·lules en repòs, els nivells de  $Ca^{2+}$  intracel·lulars són 10.000 vegades més baixos que els nivells extracel·lulars. Els canals de calci activats per voltatge controlen l'entrada de  $Ca^{2+}$  cap a l'interior de les cèl·lules excitable en resposta a la despolarització de membranes, i estan involucrats en una gran varietat de processos dependents de  $Ca^{2+}$  com la contracció muscular, l'alliberament de neurotransmissors i hormones i l'expressió gènica (Muth et al., 2001).

Els canals de  $Ca^{2+}$  activats per voltatge són complexos multimèrics formats per les subunitats  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  i  $\gamma$  (figura 5) (Gurnett i Campbell, 1996; Hofmann et al., 1999). La subunitat  $\alpha_1$  és la que dirigeix l'activitat del canal, forma el porus, és sensor de voltatge i interacciona amb la maquinària d'obertura del canal (Hofmann et al., 1999). Consta dels dominis intracel·lulars C- i N-terminal i de quatre dominis repetits (I a IV) que contenen, cada un, sis segments transmembrana (S1 a S6) i una nansa extracel·lular entre els segments S5 i S6 de cada domini (Tanabe et al., 1987). Els segments S4 a S6 són, funcionalment la part més important del canal. El segments S5 i S6 i la nansa situada entre ells formen el porus, responsable de la selectivitat pels ions. La nansa conté 20 aminoàcids que determinen l'especificitat per l'ió i estreten el porus del canal (Armstrong i Hille, 1998). El sensor de voltatge està format pels segments S4, que contenen aminoàcids carregats positivament que es mouen en resposta al voltatge, i que indueixen un canvi conformacional que obre el canal (Catterall, 1995).

Les subunitats  $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  i  $\gamma$  són auxiliars i regulen l'activitat de la subunitat  $\alpha_1$ . S'han identificat com a mínim 10 gens que codifiquen subunitats  $\alpha_1$  i de 3 a 8 gens que codifiquen per a cada una de les subunitats auxiliars. A més, hi ha fenòmens d'*splicing* alternatiu que augmenten el ventall de combinacions possibles i el grau de complexitat en la composició dels canals (Pietrobon, 2002). Les 10 subunitats  $\alpha_1$  s'agrupen en tres subfamílies ( $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  i  $Ca_v3$ ) segons el grau de similitud en la seqüència d'aminoàcids, que és idèntic en més del 70% dins d'una subfamília i en menys del 40% entre elles (Ertel et al., 2000). Les propietats electrofisiològiques i farmacològiques del canal varien bàsicament en funció de la isoforma de subunitat  $\alpha_1$  que forma el canal, generant corrents de diferents tipus anomenats N, P/Q, R, i T (Catterall, 2000) (taula 5).

**Taula 5.** Funció dels diferents tipus de canals de calci i de les subunitats formadores de porus (Catterall, 2000)

Canal de Ca <sup>2+</sup>	Subunitat alpha	Tipus de corrent de Ca <sup>2+</sup>	Localització principal	Funció
Ca <sub>v</sub> 1.1	α1S	L	Múscul esquelètic	Acoblament excitació-contracció Homeostasi del calci Regulació gènica
Ca <sub>v</sub> 1.2	α1C	L	Múscul cardíac Cèl·lules endocrines Neurones	Acoblament excitació-contracció Homeostasi del calci Regulació gènica
Ca <sub>v</sub> 1.3	α1D	L	Cèl·lules endocrines Neurones	Secreció hormonal Regulació gènica
Ca <sub>v</sub> 1.4	α1F	L	Retina	Alliberació neurotransmissors
Ca <sub>v</sub> 2.1	α1A	P/Q	Terminals nervioses Dendrites	Alliberació neurotransmissors Trànsit de Ca <sup>2+</sup> dendrític
Ca <sub>v</sub> 2.2	α1B	N	Soma neuronal Dendrites	Alliberació neurotransmissors Trànsit de Ca <sup>2+</sup> dendrític
Ca <sub>v</sub> 2.3	α1E	R	Soma neuronal Dendrites Terminals nervioses	Potencials d'acció dependents de Ca <sup>+</sup> Alliberació de neurotransmissors
Ca <sub>v</sub> 3.1	α1G	T	Múscul cardíac Múscul esquelètic Neurones	Estimulacions repetitives
Ca <sub>v</sub> 3.2	α1H	T	Múscul cardíac Neurones	Estimulacions repetitives
Ca <sub>v</sub> 3.3	α1I	T	Neurones	Estimulacions repetitives

Els canals Ca<sub>v</sub>1.1 a 1.4 generen corrents de tipus L (llarga durada) i predominen en múscul i cèl·lules endocrines. Els canals Ca<sub>v</sub>2 intervenen principalment en corrents neuronals, i inclouen els subgrups Ca<sub>v</sub>2.1 implicats en corrents de tipus P/Q, Ca<sub>v</sub>2.2 que participen en corrents de tipus N, i els Ca<sub>v</sub>2.3 que generen corrents de tipus R (Perez-Reyes et al., 1998). Aquestes dues subfamílies de canals, Ca<sub>v</sub>1 i Ca<sub>v</sub>2, exigeixen una despolarització forta per a l'activació (~50 mV), a diferència dels canals Ca<sub>v</sub>3 que s'activen a potencials molt més negatius, s'expressen en molts tipus cel·lulars i estan implicats en corrents de tipus T (Catterall, 2000). Els diferents canals de calci també són específics de regió dins de les neurones, on executen funcions diferents i independents. Les membranes presinàptiques tenen canals activats per voltatge de tipus N i P/Q que disparen l'alliberament de neurotransmissors a la fenedura sinàptica, mentre que el cos cel·lular i les dendrites contenen principalment canals de tipus L i canals de Ca<sup>2+</sup> activats per lligand que actuen en la generació de senyals, molt importants en la modificació de la força de la transmissió sinàptica. Els canals de Ca<sup>2+</sup> regulen també els processos de potenciació i depressió a llarg termini, que són la base de l'aprenentatge i la memòria (Augustine et al., 2003). El gran ventall d'efectes i la regulació del Ca<sup>2+</sup> només es poden aconseguir mitjançant una extensa xarxa de components de senyalització i un gran nombre de proteïnes com la calmodulina, calbindina, troponina C i sinaptotagmina, que s'activen en resposta a un increment en la concentració del Ca<sup>2+</sup> (Berridge et al., 2000).

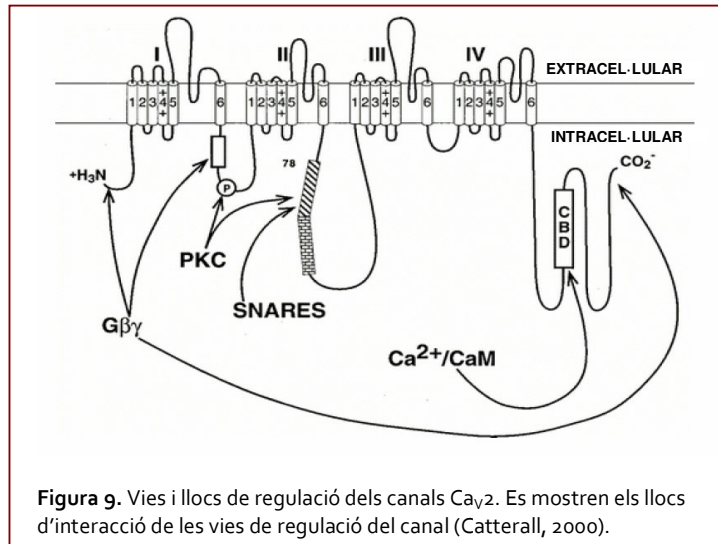
### 2.2.1 CANALS $Ca_v2.1$

Els canals  $Ca_v2.1$  tenen un paper predominant en la regulació de l'alliberament de neurotransmissors per interacció directa amb proteïnes de la maquinària de fusió de vesícules sinàptiques (Catterall, 1998). Els canals  $Ca_v2.1$  postsinàptics tenen altres funcions importants especialment al cerebel, com la modulació de l'excitabilitat neuronal, l'expressió gènica dependent d'activitat, i la supervivència i diferenciació neuronal (Pineda et al., 1998; Sutton et al., 1999; Miyazaki et al., 2004). Aquests canals estan estretament regulats per nombrosos mecanismes, donada la seva rellevància en una gran varietat de processos fisiològics bàsics (De Waard et al., 1997; Lee et al., 1999; Zhong et al., 1999). Part de la regulació és intrínseca al canal per part de les subunitats  $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , i part està regulada pel propi calci i per proteïnes extrínseques que interaccionen amb el canal.

#### 2.2.1.1 Regulació per proteïna G

La proteïna G participa en el control de la transmissió sinàptica i la secreció hormonal. Està formada per les subunitats  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  i quan s'activa pateix un canvi conformacional que allibera el domini actiu  $G_{\beta\gamma}$  de la subunitat  $G_\alpha$ . Aquest domini produirà una disminució de la susceptibilitat a l'activació dependent de voltatge en els canals de calci, conduint-los a un estat d'inactivació que només reverteix davant d'una forta despolarització. Aquest mecanisme inhibitor de les sinapsis s'activa a nivell presinàptic en resposta a neurotransmissors.

En llaç entre els dominis I i II ( $L_{I-II}$ ) de la subunitat  $\alpha_1$  és el lloc principal d'unió de  $G_{\beta\gamma}$  al canal de calci (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997), tot i que els extrems N-terminal (Zamponi et al., 1997; Canti et al., 1999), i C-terminal (Qin et al., 1997; Furukawa et al., 1998) també estarien implicats (figura 9). La unió  $G_{\beta\gamma}$ -canal de calci reverteix per l'acció de neurotransmissors que actuen a través de la proteïna cinasa C (PKC) fosforilant el llaç  $L_{I-II}$  del canal de calci prop del lloc d'unió a  $G_{\beta\gamma}$  (Zamponi et al., 1997).



### 2.2.1.2 Regulació per calci i calmodulina

La unió de calmodulina saturada de  $Ca^{2+}$  al domini C-terminal de la subunitat  $\alpha_{1A}$  del canal de calci causa en un principi facilitació i afavoreix la recuperació de la inactivació, però després augmenta la taxa d'inactivació i allarga la durada de la inactivació dependent de voltatge (Lee et al., 1999). Aquests efectes són més acusats quan el canal porta la subunitat  $\beta_{2A}$  (Lee et al., 2000).

### 2.2.1.3 Regulació per calci i proteïnes SNARE

Probablement el calci que entra a la cèl·lula és el senyal per a l'inici de la fusió de les vesícules secretores amb la membrana plasmàtica i l'alliberament de neurotransmissors i hormones a l'espai sinàptic. La sinaptotagmina, ancorada a la membrana de la vesícula sinàptica, i el complex de proteïnes SNARE, ancorat a la membrana sinàptica i format per les proteïnes sintaxina1A, SNAP-25 i VAMP/sinaptobrevina (Catterall, 2000) interaccionen directament amb la regió *synprint* situada al L<sub>II-III</sub>, entre els residus 722 i 1036 de la subunitat  $\alpha_{1A}$  dels canal de calci situats a la membrana plasmàtica. La interacció, regulada per  $Ca^{2+}$ , és clau per posicionar la vesícula de fusió i perquè la secreció sigui ràpida. S'ha observat que si s'inhibeix aquesta interacció també s'inhibeix la transmissió sinàptica (Mochida et al., 1996; Rettig et al., 1996).

El complexe SNARE també actúa sobre el canal de calci disminuint la seva expressió i provocant un canvi en la dependència de voltatge cap a potencials de membrana més negatius en l'estat d'inactivació, la qual cosa condueix a la inhibició de l'activitat del canal (Bezprozvanny et al., 1995; Wiser et al., 1996). Les fosforilacions mitjançant PKC i  $\text{Ca}^{2+}$ /CM-PK2 en diferents punts de la regió *synprint* del  $L_{\text{II-III}}$  del canal també afecten la interacció amb el complexe SNARE (Yokoyama et al., 1997).

### 2.3 CANALOPATIES

Les canalopaties són un grup de malalties que presenten una disfunció d'algun tipus de canal iònic. Les primeres canalopaties, caracteritzades fa uns 15-20 anys, van començar com a un grup de trastorns musculars anomenats paràlisis periòdiques i miotonies no distròfiques (Ptacek et al., 1991; McClatchey et al., 1992). Des de llavors, s'han implicat molts gens que codifiquen canals iònics en la fisiopatologia de diversos trastorns que afecten múscul esquelètic, cor, nervis perifèrics i cervell. A part de les canalopaties genètiques, s'han identificat canalopaties autoimmunitàries com la síndrome miastènica de Lambert-Eaton en la qual la disfunció primària no és als canals sinó que és deguda a anticossos que reconeixen els canals  $\text{Ca}_v2.1$  propis (Lennon et al., 1995) i les canalopaties transcripcionals, en què el defecte és una lesió neural que modifica la transcripció dels gens que codifiquen canals no mutats (Waxman, 2001). L'exemple seria la lesió d'un nervi perifèric, que pot conduir a l'expressió alterada de canals de  $\text{Na}^+$  i ocasionar hiperexcitabilitat, dolor neuropàtic i parestèsia.

Pràcticament totes les canalopaties tenen un caràcter episòdic, tot i que que la disfunció del canal és permanent, i moltes tenen el seu inici durant la infància. Els factors desencadenants dels episodis, com ara l'estrès i la fatiga, així com els tractaments més eficaços, en general antiepilèptics o inhibidors de l'anhidrasa carbònica, generalment són comuns a totes elles (Ptacek i Fu, 2004). El fenotip dintre i entre famílies és sovint molt variable, fins i tot els diferents episodis que presenta un mateix individu presenten variabilitat. L'heterogeneïtat de *locus* és molt freqüent, ja que mutacions en gens de canals iònics diferents poden provocar fenotips extremadament similars (Kullmann i Hanna, 2002). Un exemple és la síndrome del QT llarg, que pot ser provocada per mutacions en gens diferents en diferents famílies, que codifiquen per canals de  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  (Bulman, 1997). Les epilèpsies també són un bon exemple. D'altra banda, mutacions diferents en el mateix gen (heterogeneïtat al·lèlica) poden donar fenotips diversos. Així, diferents mutacions en el gen *CACNA1A* (OMIM \*601011) poden causar atàxia episòdica de tipus 2 (EA2), migranya hemiplègica familiar (FHM), atàxia

espinocerebel·losa de tipus 6 (SCA6) o crisis d'epilèpsia-absències. Les canalopaties, a més, tendeixen a afectar només un tipus de teixit encara que el gen en qüestió s'expressi en molts altres teixits o de forma ubíqua, l'excepció és una mutació específica en el gen *CACNA1C* responsable de la síndrome de Timothy, un trastorn multisistèmic amb símptomes diversos com arrítmia, anomalies del desenvolupament i autisme (Splawski et al., 2004).

Els mecanismes pels quals una mutació en un gen que codifica un canal iònic pot provocar una malaltia, són el guany o la pèrdua de funció del canal i els efectes dominants negatius (Felix, 2000). Per demostrar les conseqüències funcionals de les mutacions potencialment patogèniques calen proves funcionals, típicament efectuades mitjançant mètodes de *patch clamp in vitro*.

Fins ara s'han descrit al voltant d'una vintena de canalopaties que afecten el sistema nerviós central. La majoria pertanyen al grup de les epilèpsies idiopàtiques de la infància, fenotip causat per mutacions en canals iònics activats tan per voltatge com activats per lligand, i es considera que el mecanisme subjacent de la malaltia és la hiperexcitabilitat neuronal primària (Steinlein, 2004). Un altre exemple el constitueixen les atàxies episòdiques autosòmiques dominants, caracteritzades per episodis breus (EA1) o prolongats (EA2) d'incoordinació de causa cerebel·losa.

### 2.4 LA MIGRANYA COM A CANALOPATIA

Les formes monogèniques de migranya que s'han resolt a nivell molecular són degudes a alteracions en gens implicats en el transport d'ions a través de la membrana de les neurones. En concret, sabem que la migranya hemiplègica familiar (FHM) pot ser causada per mutacions en el gen *CACNA1A*, que codifica la subunitat  $\alpha_{1A}$  del canal de calci neuronal, el gen *ATP1A2*, que codifica la isoforma  $\alpha_2$  de l'ATPasa transportadora de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o el gen *SCN1A*, que codifica la subunitat  $\alpha$  del canal de sodi neuronal dependent de voltatge de tipus I.

D'altra banda, encara que no hi ha proves convincentes que relacionin aquests tres gens amb les formes comuns de migranya (MA i MO), certs trets clínics (especialment l'aparició episòdica dels símptomes i l'existència de factors desencadenants) indiquen que aquestes formes podrien ser també canalopaties. Els símptomes principals de la FHM són indubtablement molt similars als de la MA. La hiperexcitabilitat cortical i el consegüent augment de la susceptibilitat a la CSD s'ha suggerit com el mecanisme desencadenant de la cascada d'esdeveniments que condueix a ambdues categories de migranya (Moskowitz et al.,

2004). Donat que els canals  $Ca_v2.1$  juguen un paper essencial en l'alliberament del neurotransmissor excitador glutamat per part de les neurones corticals, l'augment del flux de  $Ca^{2+}$  cap a l'interior cel·lular a través de canals mutants podria conduir a la hiperexcitabilitat (Turner et al., 1992; Moskowitz et al., 2004). Tot donant suport a aquesta hipòtesi, els ratolins *knock-in* per la mutació p.Arg192Gln del gen *Cacna1a* mostren una disminució del llindar per a la CSD (Van den Maagdenberg et al., 2004). També s'ha demostrat que els canals  $Ca_v2.1$  juguen un paper en la modulació de la nocicepció trigèmica (Knight et al., 2002; Akerman et al., 2003).

Així doncs, és possible que a les formes comuns de migranya, que probablement tenen una etiologia multifactorial en la majoria de casos, la participació conjunta de diverses variants polimòrfiques en diferents gens que codifiquen canals iònics i receptors, molècules que contribueixen a mantenir el delicat equilibri d'influències excitadores i inhibidores, podrien conduir a un augment de l'excitabilitat neuronal i per tant, a la migranya (Ptacek, 1998).





## Capítol 3 Genètica de la migranya

### 3.1 HERETABILITAT: FACTORS GENÈTICS VS FACTORS AMBIENTALS

L'elevada agregació familiar que s'observa en un trastorn qualsevol suggereix, a priori, l'existència d'un component genètic hereditari o ambiental que és compartit pels individus afectats. En malalties molt comuns com la migranya, però, l'agregació familiar podria observar-se també per casualitat (Merikangas, 1996). Per estimar si hi ha factors genètics o ambientals de risc i per demostrar la seva importància relativa, podem recórrer als estudis familiars i de bessons, que permeten fer càlculs d'heretabilitat del trastorn (Kaprio, 2000).

#### 3.1.1 ESTUDIS FAMILIARS

Els primers estudis familiars en migranya van topiar amb l'absència d'un criteri de diagnòstic acurat i homogeni, però els estudis realitzats un cop establerts els criteris de diagnòstic per la IHS van demostrar clarament l'existència d'un fort component genètic. Els parents de primer grau de pacients amb MO presenten un risc relatiu de patir MO respecte els individus de la població general, de 1,9, i un risc de patir MA de 1,4, mentre que els parents de primer grau de pacients MA no tenen increment del risc relatiu (RR) de patir MO i tenen un RR de 3,8 de patir MA (Russell i Olesen, 1995). En canvi, marits i mullers de pacients afectats de MO i MA - individus no emparentats genèticament que en principi comparteixen els factors ambientals - presenten un RR de 1,5 només per MO, la qual cosa indica que MO i MA podrien ser entitats genèticament diferents, havent-hi en la MA una major determinació genètica. La situació és intermèdia en famílies MO amb edat d'inici precoç, en què el factor genètic sembla més determinant i l'herència s'apropa a un model autosòmic dominant amb penetració incompleta i expressivitat variable (Russell et al., 1993; Russell i Olesen, 1993).

#### 3.1.2 ESTUDIS DE BESSONS

Els estudis en bessons evidencien un major índex de concordança entre bessons monozigòtics (MZ), genèticament idèntics, que entre bessons dizigòtics (DZ), que comparteixen la genètica com qualsevol altra parella de germans. La concordança és del 28% per la MO en MZ i del 18% en DZ. Els factors genètics prenen més importància quan s'estudia la MA, on s'observa una concordança del 34% en MZ i del 12% en DZ (Gervil et al., 1999). L'heretabilitat ( $h^2$ , proporció de la variabilitat fenotípica atribuïble als factors genètics) estimada per totes dues categories de migranya sobrepasa el 60% (Ulrich et al., 1999a; Ulrich et al., 1999b). Si considerem la migranya en general en 30.000 parelles de germans afectats de migranya (*GenomEUtwin Project*; Peltonen, 2003), la variabilitat genètica estimada oscil·la entre el 34 i el 56% (Mulder

et al., 2003). Aquests resultats indiquen l'existència d'un component genètic important, però d'herència complexa, ja que en cap sèrie l'heretabilitat és del 100%.

### **3.1.3 MODEL DE TRANSMISSIÓ GENÈTICA**

Diversos autors han especulat sobre els diferents models d'herència: dominant (amb penetració incompleta), recessiva, materna i multifactorial. Les anàlisis indiquen que el model d'herència multifactorial és el més probable en MO i MA (Russell et al., 1995a; Ulrich et al., 1997). De totes formes també hi ha subgrups de famílies que presenten patrons d'herència mendelià o mitocondrial (Russell et al., 1995a).

### **3.1.4 LA MIGRANYA COM A SÍNDROME**

Davant de les diferències observades en els resultats dels estudis genètics, hom es planteja la possibilitat que el terme clínic 'migranya', inclogui diferents entitats genètiques. Uns quants símptomes dels que incloem dins l'espectre migranyós podrien tenir un fort component genètic i altres, en canvi, no tenir-ne cap. De fet, sovint es parla d'una síndrome, d'un conjunt de símptomes que van associats clínicament, però que podrien respondre a causes genètiques i/o ambientals diferents. Això estaria recolzat per la dificultat de detectar *loci* de susceptibilitat en els estudis de lligament genètic quan el fenotip considerat és 'ampli', i també pels estudis fisiopatològics que troben diferències, per exemple, entre les dues categories principals de l'ICHD: alguns factors desencadenants per la MA no ho són per la MO, l'edat d'inici de la simptomatologia és diferent per cada una de les entitats, el reg sanguini cerebral de la regió cortical afectada disminueix en la MA i no en la MO. Com hem vist en el capítol 1, hom pensa que el sistema fisiopatològic de la migranya és una cascada que conflueix en un esdeveniment final, la inflamació neurogènica estèril i la resposta vascular. Diferents entitats patològiques causants d'alteracions en qualsevol dels nivells d'aquesta cascada podrien presentar-se clínicament com a migranya. No obstant això, la presentació clínicament no és monomorfa i la freqüència amb què en una mateixa família trobem individus MO i MA, així com el percentatge elevat d'individus que manifesten els dos tipus d'episodis (>33%), fa pensar que les dues entitats clíniques són manifestacions de la mateixa base genètica sota diferents estímuls ambientals (Launer et al., 1999). Podríem dir el mateix per MA i FHM: ambdós tipus d'episodi poden coexistir en un mateix individu i entre els membres d'una mateixa família. A més, els pacients amb FHM tenen un risc 8 vegades superior de patir MA que la resta d'individus de la població (Thomsen et al., 2003). Malgrat aquests arguments a favor d'una causa genètica compartida, i que la HM és una categoria dintre de la MA en la ICHD, també trobem famílies FHM i famílies MA amb tipus d'herència aparentment diferents, i hi ha estudis

genètics que demostren que ambdues malalties tenen causes genètiques diferents, com a mínim en algunes famílies o individus (ex: no implicació dels gens FHM en individus MA o MO).

Per totes aquestes raons sembla important intentar establir grups clínics el més homogenis possibles per abordar la identificació dels factors genètics de susceptibilitat a les migranyes. Amb aquest objectiu, i per examinar si MO i MA són entitats separades o no, Nyholt i col·laboradors (Nyholt et al., 2004) van fer una anàlisi de classes latents (LCA), un mètode estadístic que identifica subgrups de casos a partir de variables clíniques multivariants de tipus categòric (Rindskopf i Rindskopf, 1986). D'aquesta manera van poder investigar la presència i composició de subgrups de símptomes de migranya, i van identificar 4 categories: CL0 (individus sans, assintomàtics), CL1 (forma suau de cefalea recurrent no migranyosa), CL2 (migranya de gravetat moderada, típicament sense aura visual i que compleix tots els criteris de l'IHS per a MO a excepció de la localització unilateral i nàusees/vòmits) i CL3 (forma severa de migranya, típicament amb aura visual que compleix tots els criteris IHS). Encara que l'aura es troba majoritàriament associada a CL3, gairebé una quarta part dels pacients que integren aquesta categoria no presenten aura. A més, l'aura és present en gairebé el 40% dels pacients de la categoria CL2. La classificació de LCA està basada en la severitat i combinació de símptomes i defensa que MO i MA no són entitats separades.

### 3.2 ESTUDIS GENÈTICO-MOLECULARS I: ESTUDIS DE LLIGAMENT GENÈTIC

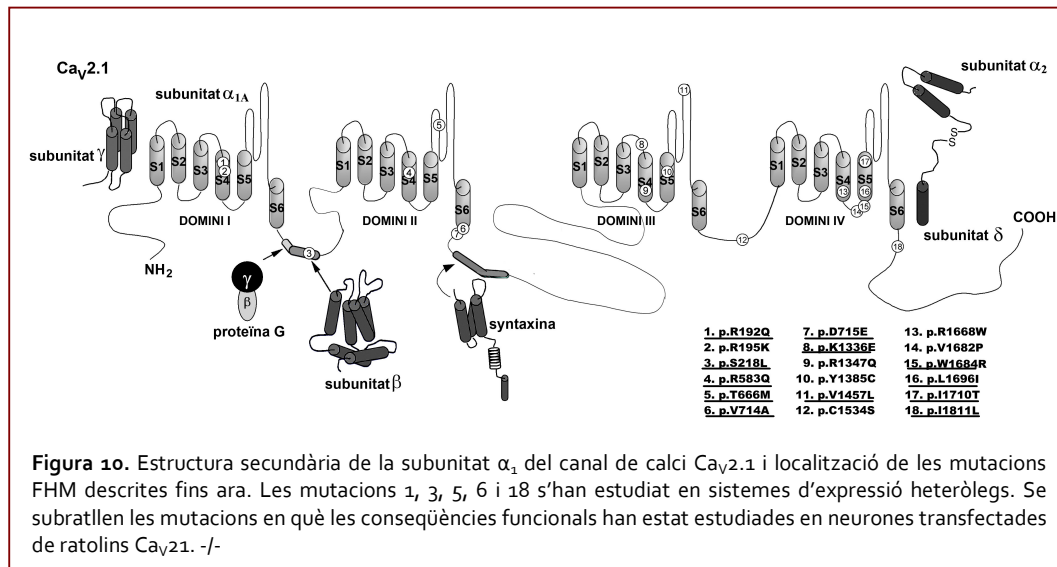
Múltiples factors genètics, ambient i estil de vida interaccionen en la complexa patogènesi de la migranya. Es tracta d'un trastorn heterogeni en què diferents individus poden tenir un únic gen causal diferent (en els casos monogènics) o presentar diferents combinacions de gens de susceptibilitat (en els casos poligènics o complexes) i una exposició també diferent als factors ambientals de risc. És per això que el mapatge de gens de susceptibilitat a la migranya és un camp encara totalment obert i desafiant que requereix un gran esforç investigador. El model d'herència més probable per les formes més prevalents de migranya és el multifactorial (poligens i factors ambientals), mentre que per a la variant rara FHM, el patró més probable és el mendelià (monogènic) de tipus autosòmic dominant. Els primers estudis de lligament significatius es van centrar en famílies amb fenotip FHM i van permetre la identificació de defectes genètics concrets en tres gens. En les formes més comuns de migranya s'han realitzat com a mínim 7 cribratges genòmics (2 d'ells en una única família extensa) així com un gran nombre d'estudis de lligament i d'associació (>40) per investigar *loci* candidats.

### 3.2.1 GENS IMPLICATS EN MIGRANYA HEMIPLÈGICA FAMILIAR (FHM)

La FHM s'hereta de forma autosòmica dominant amb penetració incompleta (Joutel et al., 1993). És genèticament heterogènia i en base al gen mutat causant de la patologia s'ha classificat en FHM<sub>1</sub>, FHM<sub>2</sub> i FHM<sub>3</sub>. Clínicament, els 3 tipus genètics de FHM són indiferenciables, a excepció de la tendència de la FHM<sub>1</sub> a englobar els pacients amb símptomes cerebel·losos progressius. La forma esporàdica, SHM, és clínicament idèntica a la FHM però sense el component familiar. La incidència de mutacions en els gens FHM en pacients SHM però, és molt baixa.

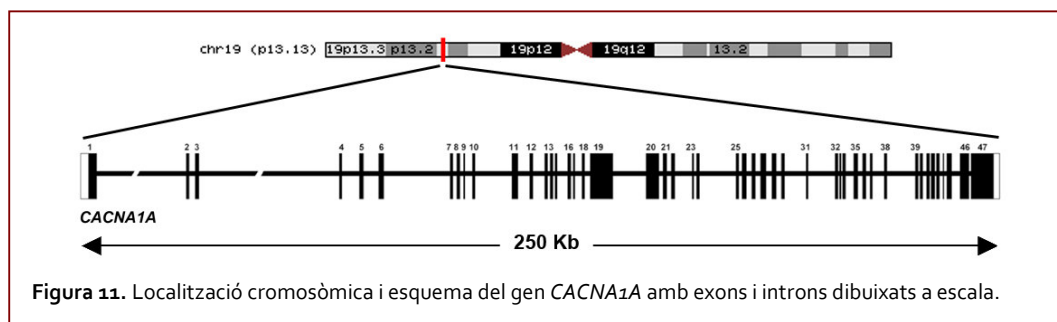
#### 3.2.1.1 Migranya Hemiplègica Familiar de tipus 1 (FHM<sub>1</sub>)

El primer *locus* lligat a FHM es va mapar al cromosoma 19p13 utilitzant dues grans genealogies i l'estratègia de lligament genètic (Joutel et al., 1993). Després de demostrar l'heterogeneïtat genètica d'aquesta malaltia, d'acotar la regió cromosòmica crítica i d'excloure el gen que codifica pel substrat de la proteïna cinasa de cadena pesada (*PRKCSH*), un grup holandès identificava mutacions causants en el gen *CACNA1A* (Ophoff et al., 1994; Ophoff et al., 1996). Actualment s'han descrit un mínim de 18 mutacions *CACNA1A* diferents en FHM<sub>1</sub> (Pietrobon, 2007) en 40 casos familiars (FHM) i 6 casos esporàdics (SHM) (Figura 10). Les mutacions FHM<sub>1</sub> són fins ara de canvi d'aminoàcid exclusivament i s'acumulen a les regions funcionalment més significatives del canal (dominis transmembrana S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> i S<sub>6</sub> i nansa P). La mutació indubtablement més comú és la p.Thr666Met, identificada en 18 famílies i en 3 casos esporàdics (Ophoff et al., 1996; Ducros et al., 1999; Friend et al., 1999; Takahashi et al., 2002; Terwindt et al., 2002; Wada et al., 2002; Kors et al., 2003; Jen et al., 2004a). Típicament, aquesta mutació provoca un fenotip de migranya hemiplègica associada a signes cerebel·losos, encara que no sembla haver-hi una relació genotip-fenotip estricta (Wada et al., 2002; Kors et al., 2003), tot suggerint que altres factors genètics o ambientals poden tenir influència sobre el fenotip. Mutacions en el gen *CACNA1A* són responsables de més del 50% dels casos de FHM si considerem famílies extenses i d'herència clarament autosòmica dominant, i el percentatge és més alt si només considerem famílies FHM amb símptomes cerebel·losos progressius.



### 3.2.1.1.1 El gen *CACNA1A*

El gen *CACNA1A* codifica la subunitat  $\alpha_1$  del canal de calci de tipus P/Q,  $Ca_v2.1$ . El transcrit, de 9,8Kb, s'ha detectat a totes les estructures del cervell que s'han relacionat amb la patogènia de la migranya, incloent el còrtex cerebral, el gangli trigemin i el nucli del tronc de l'encèfal involucrat en el control central de la nocicepció. El gen, situat al cromosoma 19p13 té una longitud d'unes 250Kb i conté 47 exons (figura 11). Codifica per 11 isoformes diferents de la proteïna que es diferencien per la presència o absència de 6 *cassettes* exònics i l'extrem N o C-terminal truncat. Hi ha com a mínim quatre possibles *cassettes* alternatius per l'últim exó, no solapats i de longitud variable, i sis probables promotors alternatius. La isoforma més llarga es tradueix en una proteïna de 2408 aminoàcids i un pes molecular de 271,9 KDa. Fins ara s'han descrit més de 60 mutacions en el gen *CACNA1A*.



### 3.2.1.1.2 La subunitat $\alpha_{1A}$ i el canal $Ca_v2.1$

Com ja em comentat, la subunitat  $\alpha_{1A}$  del canal  $Ca_v2.1$  consta de 4 dominis repetits (I-IV) amb 6 segments transmembrana cadascun (S1-S6) que comprèn el sensor de voltatge (S4) i forma el porus (segments S5 i S6 i la nansa situada entre ells) (figura 5). Juntament amb les

subunitats auxiliars  $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  i  $\gamma$ , la subunitat  $\alpha_1A$  forma el canal  $Ca_v2.1$ . Aquest s'expressa en terminals presinàptiques i membranes somatodendrítiques on juga un paper important en el control de l'alliberament de neurotransmissors en sinapsis excitadores. S'expressa a diferents àrees del cervell però principalment a cerebel ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

### 3.2.1.1.3 Estudis electrofisiològics de les mutacions FHM1

Les tècniques electrofisiològiques han estat les més utilitzades per investigar les conseqüències patològiques de la majoria de mutacions FHM1 (Kraus et al., 1998; Hans et al., 1999; Kraus et al., 2000; Tottene et al., 2002; Melliti et al., 2003; Mullner et al., 2004; Tottene et al., 2005). Fins ara s'han estudiat les conseqüències funcionals de 12 mutacions FHM1 en sistemes heteròlegs que expressen canals  $Ca_v2.1$  recombinants. S'ha vist que aquestes mutacions afecten les propietats biofísiques de canals individuals (especialment l'activació del canal), i la densitat de canals funcionals a la superfície cel·lular, però no s'ha trobat un mecanisme global comú per totes les mutacions FHM1. En totes s'ha vist un augment del flux cap a l'interior cel·lular conduït a despolaritzacions més petites i reflectint un increment de la probabilitat d'obertura del canal. També s'ha vist que l'efecte de les mutacions varia en funció del tipus de subunitat  $\beta$  present, específica de tipus cel·lular (Mullner et al., 2004), la qual cosa podria explicar alguns resultats contradictoris que suggereixen una pèrdua de funció vs efecte dominant negatiu per mutacions de FHM (Cao et al., 2004; Barrett et al., 2005; Cao i T sien, 2005).

### 3.2.1.1.4 Model de ratolí *knock-out* i el seu paper en l'estudi de mutacions FHM1

El ratolí *knock-out* pel gen ortòleg al *CACNA1A* humà, *Cacna1a*<sup>-/-</sup>, té atàxia cerebel·losa greu, distonia i degeneració cerebel·losa progressiva (Jun et al., 1999; Fletcher et al., 2001). Els models de ratolí amb mutacions espontànies en aquest gen també són fenotípicament atàxics i tenen disminuït el corrent de tipus P/Q en cèl·lules de Purkinje (Pietrobon, 2005). Tant el ratolí *knock-out* com els mutants espontanis tenen també crisis d'epilèpsia. L'expressió del 50% del gen *Cacna1a* (ratolins heterozigots  $Ca_v2.1^{+/-}$ ) porta a una disminució de la resposta d'inflamació i a dany neuropàtic, tot indicant que el canal està implicat en la sensibilització central. Utilitzant neurones cerebel·loses de ratolins *knock-out* pel gen *Cacna1a* es va deduir que la patogènesi de la FHM és deguda molt probablement a un defecte en l'activació del canal. Aquest defecte faria que el canal mutant s'obri en resposta a despolaritzacions més petites que les necessàries per obrir el canal salvatge. L'activitat del canal a potencials més negatius condueix a un increment de l'entrada de  $Ca^{2+}$  local (guany de funció a nivell de canal individual), que podria contribuir a l'hiperexcitabilitat, un possible factor subjacent a la

susceptibilitat a migranya. D'acord amb aquesta hipòtesi es va observar que l'efecte de guany de funció de la mutació p.Ser218Leu, que era la que causava un fenotip de FHM més greu, era excepcionalment gran (Tottene et al., 2005).

#### **3.2.1.1.5 Model de ratolí *knock-in* i el seu paper en l'estudi de mutacions FHM1**

El ratolí *knock-in* homozigot per les mutacions humanes FHM p.Arg192Gln i p.Ser218Leu mostra un augment de neurotransmissió a la sinapsi neuromuscular i també una susceptibilitat més gran a la depressió cortical propagant (van den Maagdenberg et al., 2004). Els estudis electrofisiològics realitzats utilitzant cèl·lules granulars cerebel·loses d'aquest model de ratolí també han proporcionat evidències del mecanisme de guany de funció en FHM.

#### **3.2.1.2 Altres malalties causades per mutacions en el gen *CACNA1A***

##### **3.2.1.2.1 Atàxia episòdica de tipus 2 (EA2)**

L'any 1946 es van descriure per primer cop pacients amb atàxia periòdica (Parker, 1946). L'atàxia episòdica de tipus 2 (EA2; OMIM #108500) es caracteritza per episodis recorrents d'atàxia severa del tronc i de la marxa (incoordinació de les extremitats i inestabilitat) i disàrtria (Vahedi et al., 1995). Els episodis, que poden durar des d'alguns minuts a uns quants dies, estan sovint associats a vertigen, nàusees, vòmits, migranya i ocasionalment diplopia (Baloh et al., 1997; Jen et al., 2004a). Els símptomes interictals inclouen principalment nistagmus i atàxia cerebel·losa permanent lleu encara que en alguns pacients l'atàxia també pot ser lentament progressiva (Vahedi et al., 1995). En casos rars, el fenotip clínic també inclou retard mental i/o epilèpsia (Denier et al., 1999; Jen et al., 2004a). És una malaltia de naturalesa episòdica amb fenotip molt variable, i els factors desencadenants inclouen estrès emocional, exercici físic, alcohol i cafeïna. L'edat d'inici és típicament a la infància, normalment abans dels 20 anys, però s'han descrit alguns casos d'inici més enllà dels 50 (Baloh et al., 1997). El 50%-70% dels pacients tenen una bona resposta al tractament amb acetazolamida (inhibidor de l'anhidrasa carbònica) (Zasorin et al., 1983) però alguns d'ells abandonen el tractament per pèrdua d'efectivitat o aparició d'efectes secundaris (Strupp et al., 2007).

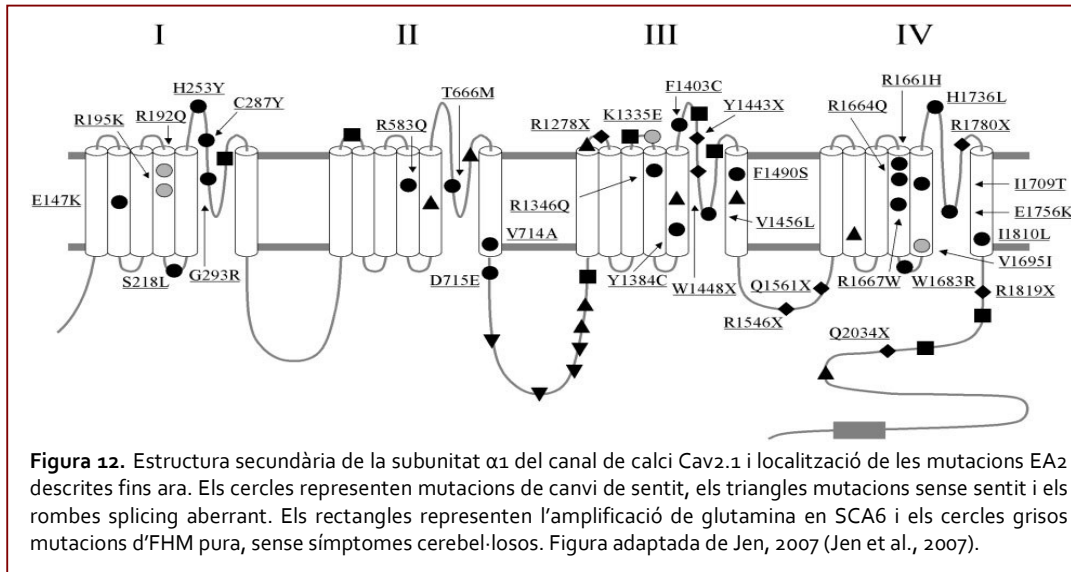
L'EA2 s'hereta com a tret autosòmic dominant amb penetració incompleta, encara que també s'han descrit alguns casos amb mutacions *de novo* (Jen et al., 2004a). Durant l'any 1995 uns quants grups obtenen evidències significatives de lligament i acoten el *locus* 19p13 (Kramer et al., 1995; Teh et al., 1995; Vahedi et al., 1995; von Brederlow et al., 1995). Un any més tard



s'identifiquen mutacions EA2 en el gen *CACNA1A*, el mateix gen implicat en FHM (Ophoff et al., 1996). El 60% de les famílies amb EA2 presenten lligament al *locus CACNA1A* (Jen et al., 2004a), la qual cosa indica que ha d'haver-hi com a mínim un altre *locus* implicat en la malaltia que encara no ha estat identificat.

S'han descrit una cinquantena de mutacions causants d'EA2 al gen *CACNA1A* (figura 12). El 60% són mutacions sense sentit que introdueixen un codó d'aturada o insercions o delecions d'uns pocs nucleòtids que provoquen un canvi de pauta de lectura i l'aparició d'un codó d'aturada prematur. El 15% de les mutacions afecten algun lloc d'*splicing*, en general el donador, amb la particularitat que dues d'elles no afecten la seqüència 100% conservada 'GT' (Wan et al., 2005a). El 25% restant són mutacions de canvi de sentit (substitucions aminoacídiques), que s'agrupen als segments altament conservats S5 i S6 del canal (Jen et al., 2004a; Mantuano et al., 2004). Per últim, petites expansions de la repetició codificant CAG que normalment són responsables del fenotip SCA6, també poden causar EA2 (Jodice et al., 1997). En resum, una àmplia gamma de mutacions situades al llarg de tot el gen *CACNA1A*, causen EA2 en una única família o pacient. No s'han detectat mutacions comuns que facilitin el diagnòstic genètic (Jen et al., 2004a).

S'han fet diversos estudis per avaluar les conseqüències funcionals de les mutacions EA2. Les mutacions truncants podrien impedir de manera parcial o completa el procés de traducció mitjançant la degradació dirigida de l'mRNA mutat pel procés de NMD (*Nonsense Mediated RNA Decay*) (Baker i Parker, 2004). D'altra banda, estudis electrofisiològics han demostrat que les mutacions EA2 sense sentit o de canvi de sentit provoquen una pèrdua de funció completa o pronunciada del canal  $Ca_v2.1$  (Guida et al., 2001; Jen et al., 2001; Wappl et al., 2002; Imbrici et al., 2004; Spacey et al., 2004) causada per la disminució en la conductància del canal i/o per la disminució de densitat de corrent. Recentment s'ha vist que dues mutacions EA2 de canvi de sentit provoquen alteracions en el tràfic del canal i alteren la seva cinètica (Wan et al., 2005b) i s'ha publicat un efecte dominant negatiu en una construcció que mimetitzava una de les mutacions truncants descrites (Page et al., 2004).



Els models de ratolí rellevants per l'EA2, són els mateixos que per a la FHM. Els fenotips *tottering* (*Cacna1a<sup>tg</sup>*), *rocker* (*Cacna1a<sup>kr</sup>*) i *rolling Nagoya* (*Cacna1a<sup>rol</sup>*) són causats per mutacions de canvi de sentit i es caracteritzen per atàxia relativament suau i, amb l'excepció del *rolling Nagoya*, per crisis intermitents que recorden l'epilèpsia amb crisis d'absència humana (Fletcher et al., 1996; Mori et al., 2000; Zwingman et al., 2001). Una mutació d'*splicing* a l'extrem 3' del *Cacna1a* és responsable del fenotip *leaner* (*Cacna1a<sup>tg-la</sup>*), caracteritzat per atàxia més severa, degeneració de neurones cerebel·loses i esperança de vida reduïda (Fletcher et al., 1996). Els estudis electrofisiològics han mostrat que l'efecte principal de les mutacions *tottering*, *leaner* i *rolling Nagoya* és, igual que en les mutacions EA2, una marcada reducció en la densitat de corrent de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wakamori et al., 1998; Mori et al., 2000). A més, els ratolins *tottering* i *leaner* presenten defectes en l'alliberament de neurotransmissors i llindars elevats per al desencadenament de la depressió cortical propagant (Caddick et al., 1999; Ayata et al., 2000; Plomp et al., 2000). Una mutació en el lloc d'unió de la subunitat  $\beta_4$  a la subunitat  $\text{Ca}_v2.1$  també produeix atàxia i convulsions en el ratolí *lethargic* (Burgess et al., 1997).

S'han creat dues soques de ratolins *knock-out* *Cacna1a* diferents (Jun et al., 1999; Fletcher et al., 2001). Com que els corrents dels canals de tipus L i N d'aquests ratolins *knock-out* són elevades, compensen la manca de corrents de tipus P/Q i la vida és al principi viable, però més tard desenvolupen un dèficit neurològic ràpid i progressiu amb atàxia i distonia i moren a l'edat de 3-4 setmanes. Igual que el ratolí mutant espontani, els animals *knock-out* heterozigots són sans tot i que la densitat de corrent de tipus P/Q està reduïda en un 50% (Fletcher et al., 2001).

### 3.2.1.2.2 Atàxia espinocerebel·losa de tipus 6 (SCA6)

Les atàxies espinocerebel·loses (SCAs) comprenen un grup gran i heterogeni de malalties neurodegeneratives lentes i progressives heretades de forma dominant. L'SCA6 es caracteritza per atròfia de les cèl·lules de Purkinje i condueix a una atàxia cerebel·losa d'inici tardà. La prevalença global de les SCAs s'estima en un 0,003% i els pacients SCA6 suposen al voltant d'un 15% del total de casos de SCAs (Schols et al., 2004). L'SCA6 és un trastorn de poliglutamines causat per petites expansions d'un codó glutamina (CAG) repetit en tàndem situades a l'extrem 3' del gen *CACNA1A* (Zhuchenko et al., 1997; Frontali, 2001). Es pensa que el mecanisme patogènic dels trastorns de poliglutamina és la formació d'agregats citotòxics (precipitats de proteïnes amb poliglutamines) dins les neurones (Schols et al., 2004). Tanmateix, l'SCA6 es diferencia d'altres malalties d'amplificació de trinucleòtids en què l'expansió és excepcionalment petita (21-33 còpies) i relativament estable (Zhuchenko et al., 1997; Frontali, 2001) i l'anticipació és rara (Frontali, 2001). En base a aquests trets i a evidències electrofisiològiques recents, alguns autors han suggerit que són els canals  $Ca_v2.1$  no funcionals i no els agregats citotòxics els que provoquen el fenotip SCA6 (Mattsson et al., 2000; Toru et al., 2000). Aquesta malaltia podria considerar-se més una canalopatia que un trastorn de poliglutamina (Frontali, 2001).

### 3.2.1.2.3 Epilèpsia idiopàtica generalitzada

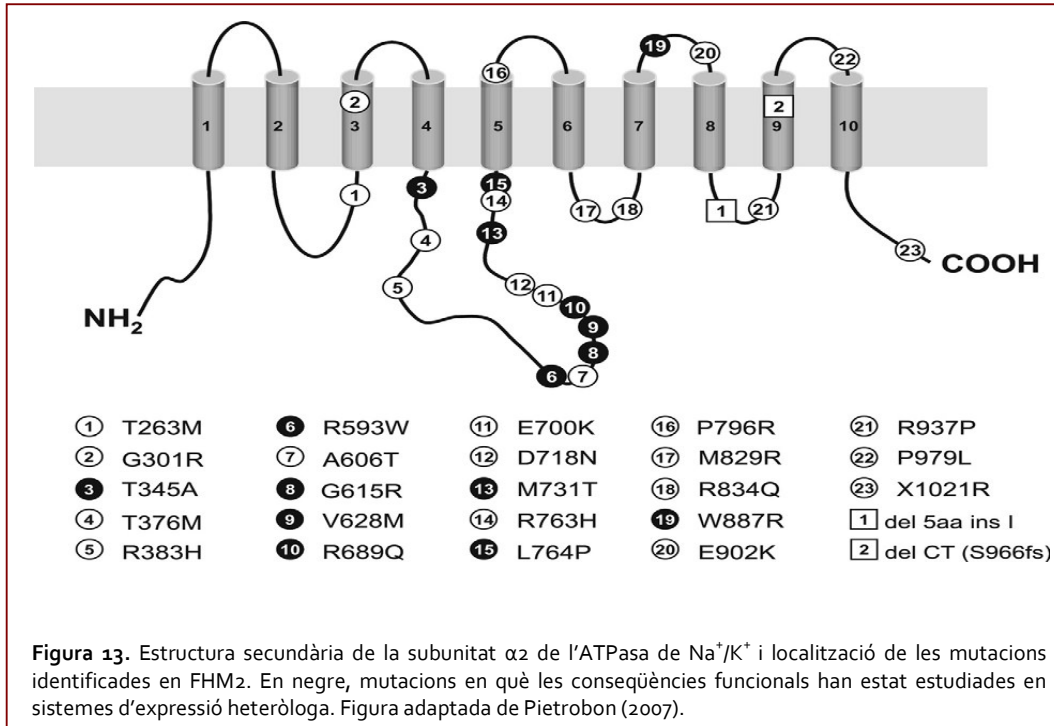
En una família i en un pacient esporàdic s'ha observat que les mutacions en el gen *CACNA1A* cosegüen amb un fenotip complex d'atàxia i epilèpsia generalitzada o absències infantils (Jouveneau et al., 2001; Imbrici et al., 2004). A més, SNPs localitzats als voltants i dins de l'exó 8 del gen *CACNA1A* s'han associat a epilèpsia idiopàtica generalitzada (Chioza et al., 2001). No obstant, aquest és un tema controvertit, ja que en un estudi posterior de replicació no es va trobar cap evidència d'associació (Sander et al., 2002).

### 3.2.1.3 Migranya Hemiplègica Familiar de tipus 2 (FHM2) i gen *ATP1A2*

L'any 1997 es descobria un segon *locus* FHM al cromosoma 1q21-23 (Ducros et al., 1997). Sis anys més tard s'acotava la regió crítica a 1q23 (Marconi et al., 2003) i s'identificaven mutacions en el gen *ATP1A2*, que codifica la subunitat  $\alpha_2$  de l'ATPasa de sodi/potassi (De Fusco et al., 2003). Es tracta del component actiu de l'enzim que catalitza la hidròlisi d'ATP acoplada a l'intercanvi dels ions  $Na^+$  i  $K^+$  a través de la membrana plasmàtica. Aquesta acció crea un gradient electroquímic de sodi i potassi que suministra energia per transportar diferents nutrients. La FHM2 representa entre el 20 i el 30% dels casos de FHM.

Les ATPases de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  consten de com a mínim tres subunitats, la subunitat  $\alpha$  catalítica, la subunitat  $\beta$  moduladora, i una subunitat de funció desconeguda  $\gamma$ . Fins ara s'han descrit quatre isoformes de subunitat  $\alpha$  específiques de teixit i totes, excepte l' $\alpha_4$ , s'expressen al cervell (Moseley et al., 2003). La subunitat  $\alpha_1$  s'expressa de forma ubíqua. L'expressió d' $\alpha_3$  està restringida a neurones i cor, mentre que la subunitat  $\alpha_2$  és més abundant a múscul esquelètic, cor i cervell, especialment a les cèl·lules de la glia (astròcits) (Orlowski i Lingrel, 1988; Watts et al., 1991). Tanmateix, com a mínim en ratolins, l'isoforma  $\alpha_2$  s'expressa a alts nivells en neurones durant el desenvolupament i en el moment del naixement (Moseley et al., 2003).

La subunitat  $\alpha_2$  consta de 10 dominis transmembrana, amb una gran nansa intracel·lular entre els dominis 4 i 5 (Kaplan, 2002). El gen *ATP1A2* consta de 23 exons, que s'estenen al llarg d'unes 25 kb (Shull et al., 1989). Fins ara s'han descrit al voltant de 30 mutacions FHM2 (figura 13) (De Fusco et al., 2003; Vanmolkot et al., 2003a; Vanmolkot et al., 2003b; Jurkat-Rott et al., 2004; Kaunisto et al., 2004; Spadaro et al., 2004; Riant et al., 2005; Pierelli et al., 2006; Vanmolkot et al., 2006a; Vanmolkot et al., 2006b; Castro et al., 2007). La majoria estan situades a les nanses intracel·lulars de la proteïna. La gran nansa que hi ha entre els dominis 4 i 5 és crítica pel correcte funcionament del canal, ja que conté els dominis hidrolasa i d'unió a ATP i pateix canvis conformacionals essencials durant el cicle enzimàtic (Kaplan, 2002). Totes, a excepció de dues, són mutacions de canvi de sentit. D'aquestes dues, p.X1021Arg elimina un codó d'aturada allargant la proteïna 27 aminoàcids (Jurkat-Rott et al., 2004) i l'altra, una deleció de 2 nucleòtids, c.2897-2898>fs, provoca un canvi de pauta de lectura i l'aparició d'un codó d'aturada prematur en el penúltim exó del gen, p.Ser966fs (Riant et al., 2005). La transfecció de cèl·lules amb construccions mutants del gen *ATP1A2* ha resultat, en funció de la mutació, en l'abolició total de l'activitat de l'ATPasa de sodi/potassi o en alteracions cinètiques subtils que porten a una disminució de l'activitat (De Fusco et al., 2003; Segall et al., 2004; Segall et al., 2005)



A més de les mutacions esmentades més amunt, s'han identificat 4 mutacions de canvi de sentit en famílies amb formes comuns de migranya (Todt et al., 2005) i 2 mutacions també de canvi de sentit en famílies amb hemiplègia alternant de la infància (Bassi et al., 2004; Swoboda et al., 2004). No hi ha cap diferència fenotípica definitiva entre FHM1 i FHM2, exceptuant el fet que la penetració sembla una mica més baixa en FHM2 (Ducros et al., 1997) i que els signes cerebel·losos són més freqüents en famílies amb FHM1. Tanmateix, s'han descrit signes cerebel·losos subtils en alguns individus amb familiars afectats de FHM2 (Cevoli et al., 2002; Spadaro et al., 2004). En una família en què segregava FHM i convulsions infantils familiars benignes (BFIC) (Vanmolkot et al., 2003a) es va detectar la mutació p.Arg689Gln.

No s'han identificat ratolins amb mutació espontània en el gen *Atp1a2*, però es disposa de soques de ratolins *knock-out* per aquest gen. El ratolí *Atp1a2*<sup>-/-</sup> mor al naixement perquè és incapaç de respirar, possiblement a causa d'una activitat alterada en neurones del centre respiratori (Moseley et al., 2003). L'augment de l'activitat neuronal com a resultat d'una recaptació defectuosa de neurotransmissors provoca una gran pèrdua de neurones de l'amígdala i de l'escorça piriforme en aquests ratolins (Ikeda et al., 2003). Els ratolins *Atp1a2*<sup>+/-</sup> semblen sans i tenen augmentada la força de contracció dels músculs cardíac i esquelètic (Lingrel et al., 2003), però presenten conductes d'ansietat i activitat neuronal augmentada a l'amígdala i a l'escorça piriforme després d'un estímul d'angoixa (Ikeda et al., 2003). Els

ratolins *knock-in* portadors de mutacions FHM2 augmentarien el nostre coneixement sobre la fisiopatologia de la FHM, però encara no s'han desenvolupat.

#### 3.2.1.4 Migranya Hemiplègica Familiar de tipus 3 (FHM3) i gen *SCN1A*

El tercer *locus* per la FHM, situat a 2q24, s'ha identificat molt recentment (Dichgans et al., 2005a) i conté el gen responsable de la malaltia: *SCN1A*. Aquest gen codifica un canal de sodi activat per voltatge a través del qual els ions  $\text{Na}^+$  creuen la membrana a favor de gradient electroquímic. En aquest gen s'han descrit més de 270 mutacions associades a diferents fenotips d'epilèpsia i només dues mutacions responsables de FHM: p.Gln1489Lys, identificada en 3 famílies alemanyes no relacionades entre elles (Dichgans et al., 2005a), i p.Leu1649Gln (Vanmolkot et al., 2007), present en un única família d'origen nord-americà.

Estudis funcionals de la mutació p.Gln1489Lys demostren que provoca una acceleració de la recuperació de la inactivació ràpida, fet que probablement condueix a una activació excessiva de les neurones que expressen el canal mutant (Dichgans et al., 2005a). En la mateixa línia, estudis funcionals de la mutació p.Leu1649Gln revelen, a més de la recuperació doblement ràpida de la inactivació ràpida, un marcat enlentiment de la inactivació, predient també hiperexcitació neuronal (Vanmolkot et al., 2007).

#### 3.2.2 GENS IMPLICATS EN FORMES COMUNS DE MIGRANYA

Tot i que es creu que les formes comuns de migranya (MA i MO) segueixen en general un model etiològic de tipus multifactorial, amb diversos gens que interaccionen amb l'ambient per donar un risc de patir el fenotip, s'admet que podrien haver-hi també formes monogèniques amb patrons d'herència mendelians. És en aquestes situacions que l'anàlisi de lligament pot ser una eina adequada d'estudi.

##### 3.2.2.1 Estudis de lligament a *loci* prèviament identificats en FHM

L'estudi de la implicació dels gens prèviament descrits com a responsables de formes monogèniques de migranya (FHM) en les formes comuns de migranya ha estat objecte de moltes investigacions. Es va pensar que les mateixes vies implicades en FHM també podien participar en les categories MO i MA, ja que en una mateixa família i fins i tot en un mateix individu es donen episodis de FHM, MA i MO.

Els resultats a favor de la implicació del *loci* **19p13** en formes comuns de migranya són poc convincents, encara que algunes publicacions suggereixen lligament (May et al., 1995; Nyholt et al., 1998b; Terwindt et al., 2001). L'anàlisi mutacional del *CACNA1A* en pacients MO i MA van fracasar (Kim et al., 1998; Brugnoli et al., 2002; Wieser et al., 2003; Jen et al., 2004b), fins

i tot en famílies amb formes comuns de migranya lligades al *locus* 19p13 (Lea et al., 2001). Encara que no es pot descartar la contribució del gen *CACNA1A* com a risc genètic per a les formes comuns de migranya, és possible que un gen proper dins la regió 19p13 confereixi un risc major per la MA. Aquesta idea sorgeix d'un estudi de lligament realitzat en 16 famílies amb MA en què s'identifica un *locus* proper però diferent al *CACNA1A* (Jones et al., 2001). En relació als gens continguts en aquesta regió, es van associar variants polimòrfiques en el gen del receptor de la insulina al fenotip MA (McCarthy et al., 2001), encara que cal interpretar aquesta troballa amb prudència ja que en un segon estudi realitzat en 72 famílies finlandeses no es va detectar lligament (Kaunisto et al., 2005). Tampoc es van detectar mutacions en seqüenciar el gen d'un dels individus pertanyents a una de les dues famílies MA lligades a 19p13 (Curtain et al., 2006).

Investigant el *locus* 1q31, identificat prèviament en una família FHM (Gardner et al., 1997), en formes comuns de migranya es va detectar lligament a una família extensa australiana amb individus MA i MO, però aquest no es va mantenir amb l'addició a l'anàlisi de 82 famílies petites i independents de la mateixa nacionalitat (Lea et al., 2002). De totes maneres, encara no s'ha identificat el gen responsable, ni en famílies FHM ni en famílies MA/MO.

La implicació del gen *ATP1A2* en MO i MA no s'ha estudiat tan minuciosament com la del gen *CACNA1A*, possiblement perquè la seva identificació és molt més recent. La recerca de mutacions en el gen *ATP1A2* en individus amb formes comuns de migranya ha resultat sempre negativa (Jen et al., 2004b; Curtain et al., 2005), encara que s'han identificat variants rares en 2 de 45 famílies amb migranya (Todt et al., 2005) i s'ha trobat evidència de lligament a aquest *locus* en dos cribratges genòmics a gran escala (Lea et al., 2005a; Nyholt et al., 2005).

### **3.2.2.2 Estudis de lligament a altres regions candidates**

Com que la migranya és més freqüent en dones que en homes, s'ha especulat sobre la possibilitat que en algunes famílies factors genètics lligats al cromosoma X estiguin involucrats en la malaltia. En dues famílies australianes s'ha trobat lligament a Xq24-28 (Nyholt et al., 1998a; Nyholt et al., 2000), regió que inclou el gen *HTR2C* (que codifica el receptor de serotonina 2C) com a possible candidat, però la seva anàlisi ha resultat negativa tan en la recerca de mutacions com en els estudis d'associació que s'han dut a terme (Johnson et al., 2003).

Recentment s'ha fet un estudi de lligament a la regió del cromosoma **15q11-q13** que conté tres gens que codifiquen el receptor GABA-A en 10 famílies italianes amb MA (Russo et al.,

2005). Es va obtenir lligament significatiu en 5 de les famílies, però l'anàlisi mutacional dels gens no va detectar cap alteració molecular, només la presència d'una variant polimòrfica en el gen *GABRB3* en els individus afectats d'una de les famílies (Russo et al., 2005).

### 3.2.2.3 Estudis de lligament a nivell genòmic en formes comuns de migranya

El primer cribratge genòmic a gran escala en formes comuns de migranya es va fer l'any 2002 en 50 famílies amb MA i un patró d'herència autosòmic dominant, i va permetre identificar un *locus* a la regió cromosòmica **4q24** (Wessman et al., 2002). L'any 2003 es detecta un *locus* molt proper, a **4q21**, en famílies MO quan es consideren només dones afectades i es considera una definició "relaxada" del fenotip MO (Bjornsson et al., 2003). El segon cribratge genòmic es fa en una única família amb MO i MA d'herència autosòmica dominant i s'obté lligament significatiu a **6p12.2-p21.1**. La regió s'ha acotat recentment a 8,5Mb i s'han descartat mutacions en 9 gens candidats, encara que s'han identificat variants polimòrfiques rares associades a l'haplotip que cosegrega amb la malaltia en individus afectats en els gens de la meprina (*MEP1A*) i de la glicoproteïna associada al factor rhesus (*RHAG*). En l'estudi d'una única família del nord d'Itàlia amb MO i patró d'herència aparentment autosòmic dominant, es va trobar lligament a **14q21.2-q22.3** (Soragna et al., 2003). El mateix any es troba lligament al cromosoma **11q24** (Cader et al., 2003) en 43 famílies canadenques amb MA i herència autosòmica dominant. Recentment, en un cribratge genòmic a gran escala en que s'analitzen 756 famílies italianes amb migranya classificades per LCA, s'obté lligament a la regió cromosòmica **5q21** i es repliquen els *loci* **6p12.2-p21.1** i **1q21-q23** (Nyholt et al., 2005). També s'han obtingut LOD scores suggestius de lligament als *loci* 3q29 i 18p11 en les formes hereditàries més severes de migranya (CL3) classificades mitjançant LCA (Lea et al., 2005a). El 80% dels pacients inclosos en la categoria CL3 compleixen els criteris de la IHS per MA, i el 20% restants per MO. A la taula 6 es mostren els estudis de lligament significatius publicats fins ara.



Taula 6. Cribratges genòmics amb LOD score significatiu de lligament a variants de migranya.

Població	Fenotip	n famílies	Regió Cromosòmica	Data d'identificació del locus	Gen i data d'identificació del gen
Europea/ Americana	FHM	2	19p13	1993 (Joutel et al., 1993)	CACNA1A, 1996 (Ophoff et al., 1996)
Italiana	FHM	1	1q23	1997 (Ducros et al., 1997)	ATP1A2, 2003, (De Fusco et al., 2003)
Australiana	FHM	1	1q31	1997 (Gardner et al., 1997)	No identificat
Europea	FHM	3	2q24	2005 (Dichgans et al., 2005)	SCN1A, 2005 (Dichgans, 2005)
Finlandesa	MA	50	4q24	2002 (Wessman et al., 2002)	No identificat
Canadenca	MA	43	11q24	2003 (Cader et al., 2003)	No identificat
Islandesa	MO	103	4q21	2003 (Björnsson et al., 2003)	No identificat
Italiana	MO	11	14q21-22	2003 (Soragna et al., 2003)	No identificat
Sueca	MA i MO	1	6p12-21	2002 (Carlsson et al., 2002)	No identificat
Finlandesa	Tret pulsatiu	50	17p13	2006 (Anttila et al., 2006)	No identificat
	Síntomes migranya		18p11		No identificat

FHM= migranya hemiplègica familiar, MA= migranya amb aura, MO= migranya sense aura, LCA= anàlisi de classes latents.

### 3.3 ESTUDIS GENÈTICO-MOLECULARS II: ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ

Els estudis d'associació de tipus cas-control o familiars són una bona eina per a la identificació de gens de susceptibilitat a les formes comuns de migranya, en què el model etiològic més probable implica la contribució de poligens i factors ambientals. Ja fa uns quants anys que, partint dels coneixements fisiopatològics de la migranya existents, es van començar a publicar estudis d'associació d'aquests fenotips a al·lels específics de gens funcionalment candidats que estan presents a la població general, però son pocs els que s'han replicat en estudis independents i en cap d'ells s'ha pogut confirmar una implicació funcional (efecte biològic de la variant associada en ser estudiada en cèl·lules o en models animals). L'excepció és la variant p.Cys677Thr del gen *MTHFR*, que codifica l'enzim reductasa de metil-tetrahidrofolat. Aquesta variant, que s'ha associat a MA en diverses poblacions, disminueix l'activitat enzimàtica a menys de la meitat respecte a la proteïna WT i a més comporta hiperhomocisteïnèmia, que augmenta el risc de fenòmens trombotics (Kowa et al., 2000; Kara et al., 2003; Lea et al., 2004; Oterino et al., 2004; Lea et al., 2005b; Scher et al., 2006). La controvèrsia en la majoria de resultats publicats és deguda probablement a l'heterogeneïtat en el disseny dels estudis que varien en número d'individus analitzats, població, subcategoria analitzada (diferents combinacions d'endofenotips), utilització de diferents polimorfismes d'un mateix gen i separació per sexes. Els estudis amb resultats positius poden agrupar-se en dos grans blocs: aquells que identifiquen gens relacionats amb l'origen de l'episodi migranyós o bé gens

relacionats amb la fisiopatologia de la migranya. Aquests blocs inclouen gens involucrats en la funció neurotransmissora, vascular i hormonal, com per exemple components de senyalització serotoninèrgica i dopaminèrgica, sintases d'òxid nítric, components del sistema de l'endotelina, receptors de progesterona i estrògens i TNF $\beta$  (taula 7).

**Taula 7.** Gens candidats i polimorfismes associats a migranya en estudis publicats des de l'any 2000 amb un mínim de 200 casos i 200 controls.

Gen	Cr	Polimorfisme	Mida de l'estudi	Població	Al·lel/genotip associat, valor de p, OR	Fenotip associat	Referència
<b>ESR1</b>	6q25.1	rs2228480	275 pacients 275 controls	Australiana	A, p=0.003, 1,96	Migranya	Colson et al., 2004
			300 pacients 300 controls		A, p=8x10 <sup>-6</sup> , 1,96		
		rs1801132	367 pacients 232 controls	Espanyola	C, p=0,008, OR homozigots C/C 3.24	Migranya Dones	Oterino et al., 2006
		26 SNP	898 MA 900 controls	Finlandesa	A (rs6557170), p=0.014, 1,21 <small>(en l'ID amb rs1801132)</small>	MA	Kaunisto et al., 2006
<b>PGR</b>	11q22-23	PROGINS Alu	275 pacients 275 controls	Australiana	Alu, p=0,017, 1,7 <small>*interacció amb rs222848A (OR=3,2)</small>		Colson et al., 2005
			300 pacients 300 controls		Alu, p=0,003, 1,7		
<b>INSR</b>	19p13	5 SNPs intragènic	377 MA 450 MO 765 controls	EEUU	(SNP84), p=0,005,	MA Dones	McCarthy et al., 2001
			275 pacients 275 controls	Australiana	(SNP84), p=0,016	MO	
<b>MTHFR</b>	1p36.3	C677T	170 MA 100 MO 270 controls	Australiana	T, p=0,017, 2,54	MA	Lea et al., 2004
			187 MA 226 MO 1212 controls	Alemana	T/T, p<0.006, 2,05	MA	Scher et al., 2006
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	6p21.3	-308 G/A	299 pacients 306 controls	Italiana	G/G, p<0,001, 2,85	Migranya	Rainero et al., 2004
			221 pacients 183 controls	Iraní	A, p<0,0001, 3,73	MO	Mazaheri et al., 2006
<b>ACE</b>	17q23	ACE-D (ins/del)	302 MO 201 controls	Siciliana	del/del, p<0,05	MO	Paterna et al., 2000
<b>LDLR</b>	19p13.2	Repetició TA	140 MA 220 MO 200 controls	Italiana	4 (10 rep), p=0,033	MO	Mochi et al., 2003
<b>HLA-DRB1</b>	6p21.3	HLA-DRB1*16	41 MA 214 MO 325 controls	Italiana	DRB1*16, p=0,02	MO	Rainero et al., 2005
<b>DBH</b>	9q34	Ins/del	275 pacients 275 controls	Australiana	p=0,003	MA	Fernandez et al., 2006
<b>GNAS1</b>	20q13.3	T393C	365 pacients 347 controls	Espanyola	C/C, p=0,003, 1,79	Migranya	Oterino et al., 2007

Cr= regió cromosòmica, MA= migranya amb aura, MO= migranya sense aura, OR= odds ratio, SNP= polimorfisme d'un únic nucleotid, UTR= regió no traduïda, ESR1: receptor d'estrògens 1, PGR: receptor de progesterona, INSR: receptor d'insulina, MTHFR: reductasa de metil-tetrahidrofolat, TNF $\alpha$ : factor de necrosi tumoral, ACE: enzim convertidor d'angiotensina, LDLR: receptor lipoproteic de baixa densitat, DBH: dopamina beta hidroxilasa.



## Capítol 4 Cercant els gens responsables de la malaltia

### 4.1 ELS ELEMENTS IMPRESCINDIBLES

#### 4.1.1 PACIENTS

Els individus amb el fenotip d'interès són crucials per identificar el gen o gens responsables de la malaltia. Un procediment de diagnosi prudent i minuciós és un requisit indispensable perquè l'estudi arribi a bon port. El tipus de mostra a recollir pot variar entre famílies extenses, trios formats per pares amb un fill afectat, parelles de bessons, o mostres no emparentades de casos i controls. Cadascun dels dissenys té els seus avantatges i inconvenients, i normalment s'acaba utilitzant una combinació, solució de compromís entre el que hom vol trobar, el cost en temps i esforços i la capacitat i possibilitats d'aconseguir el tipus de mostra necessària. Les famílies extenses són la millor opció (i probablement la mostra més difícil d'aconseguir) quan es busquen variants d'alta penetració (un o uns pocs gens d'efecte major). És millor utilitzar una sola família que moltes de petites per evitar el problema de l'heterogeneïtat genètica que dificultaria la identificació del gen. En canvi, quan es busquen variants de baixa penetració (diversos gens d'efecte menor), les mostres més adequades són els grups numerosos de casos i controls o de trios familiars.

#### 4.1.2 MARCADORS GENÈTICS

En principi, qualsevol posició polimòrfica al genoma que presenti una herència mendeliana pot utilitzar-se com a marcador genètic. Aquest polimorfisme permet rastrejar la transmissió d'un fragment cromosòmic a través d'un arbre genealògic. Hi ha molts elements de variació genètica en el genoma, com p.ex. grans reordenaments cromosòmics, CNVs (>1Kb), elements transposables (280pb a poques kb), petites deleccions/insercions (1pb a poques Kb), minisatèl·lits o microsatèl·lits (<150pb) o SNPs (1pb). Com més petit és el fragment, més abundant sol ser l'element de variabilitat al genoma, i per tant potencialment més útil. Els polimorfismes de longitud de fragments de restricció bial·lèlics (RFLPs) van ser els primers marcadors d'àcid desoxiribonucleic (ADN) en ser utilitzats, però l'impuls definitiu per a l'avenç en la identificació de gens responsables de malalties va arribar amb el mapatge del marcadors microsatèl·lits (repeticions de 2 o 5 nucleòtids, altament polimòrfiques). Hi ha diferents mapes de marcadors microsatèl·lits del genoma humà, públics i privats (Genethon; Dib et al., 1996); deCODE Genetics (Kong et al., 2002), Marshfield (Weber, 2002), que contenen informació precisa de més de 10.000 marcadors altament polimòrfics.

### 4.1.2.1 Marcadors microsatèl·lits (STRPs) vs polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs)

El desenvolupament de mapes de marcadors microsatèl·lits de gran densitat (cobertura per sota d'1 cM) va ser crucial per a la identificació de gens responsables de malalties monogèniques en famílies afectades mitjançant estudis de lligament, i encara avui continua sent una eina poderosa en l'estudi de les malalties monogèniques que encara queden amb causa desconeguda. Amb l'avenç de la tecnologia, el seu ús es va anar automatitzant, però presenten un gran inconvenient: la seva genotipació requereix la determinació de la mida del producte amplificat per PCR mitjançant electroforesi. A més, els productes poden presentar nombroses bandes mirall que poden afectar l'assignació correcta dels al·lels.

Els mètodes d'estudi per a malalties amb un component genètic més complex requereixen una densitat de marcadors molt més alta i per tant una automatització molt més gran que la que es pot assolir amb els marcadors microsatèl·lits. Les variants bial·lèliques d'un sol nucleòtid són l'eina que ha permès superar les limitacions dels marcadors microsatèl·lits. Es tracta de polimorfismes causats per substitucions nucleotídiques o per insercions o delecions d'un sol nucleòtid. Encara que menys polimòrfics, són molt més abundants al genoma, i Kruglyak i Lander (1995) van demostrar que podien proporcionar la mateixa informació que els marcadors microsatèl·lits només doblant la seva densitat. D'altra banda, la seva detecció i anàlisi es pot automatitzar en plataformes de genotipació a gran escala amb estalvi en temps i costos. Un altre avantatge dels SNPs és que el seu índex de mutació és més baix que el dels microsatèl·lits. Actualment les bases de dades públiques com dbSNP (build 128; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) i SNPper (<http://snpper.chip.org/>) contenen més d'11 milions d'SNPs, dels quals més de 6 milions han estat validats ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_summary.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi)). Si considerem que el mapa d'SNPs publicat l'any 2001 només contenia 1.4 milions de SNPs (Sachidanandam et al., 2001), el progrés en aquest camp ha estat excepcionalment ràpid, principalment a causa del desenvolupament de tècniques de genotipació d'SNPs d'alt rendiment (Syvanen, 2001). Tanmateix, a la base de dades de dbSNP (build 128), la informació de freqüència només està disponible per 737.679 dels SNPs.

### 4.1.3 DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

El fet que la co-ocurrència de variants polimòrfiques particulars al voltant d'un al·lel relacionat amb una malaltia es doni més sovint del que esperariem per casualitat (desequilibri de lligament) pot ser una eina important en el mapatge d'un gen, tant en l'estudi de malalties monogèniques com en el cas de les malalties complexes. Aquest fenomen s'esdevé quan diferents individus amb un trastorn determinat tenen la causa del trastorn en una variant/mutació idèntica heretada d'un ancestre comú, de tal manera que comparteixen una regió cromosòmica més o menys gran al voltant del canvi. Així, l'al·lel associat a una malaltia no necessàriament n'és la causa, però està situat suficientment a prop de la variant de susceptibilitat com per mantenir el desequilibri de lligament amb ella al llarg de les generacions tot i els fenòmens de recombinació. Fins fa uns anys, el desequilibri de lligament s'havia fet servir per refinar el mapatge de regions genòmiques implicades en trastorns monogènics en poblacions aïllades (Hastbacka et al., 1994), però la utilització d'estudis d'associació genòmics per a la identificació de gens implicats en malalties complexes ha augmentat el seu interès. La utilització d'haplotips enlloc d'SNPs independents en les anàlisis d'associacions pot incrementar les probabilitats d'èxit en determinades situacions en què hi ha múltiples al·lells de susceptibilitat en un mateix gen (Morris i Kaplan, 2002; Clark i Dean, 2004).

### 4.1.4 MÈTODES ESTADÍSTICS

#### 4.1.4.1 Anàlisi de lligament

L'anàlisi de lligament genètic, mètode utilitzat fonamentalment per al mapatge de gens responsables de malalties monogèniques, consisteix en la determinació de la localització cromosòmica del *locus* del trastorn mitjançant marcadors genètics en famílies amb uns quants individus afectats. Quan una regió cromosòmica concreta es transmet en famílies de la mateixa manera que el fenotip de la malaltia, aquesta regió probablement conté el gen causant de la malaltia. La base per a l'anàlisi de lligament és el fet que *loci* físicament propers en un cromosoma normalment no recombinen entre ells, de manera que determinats al·lells d'aquests *loci* es transmeten conjuntament durant la meiosi en una família (Strachan, 1996). La fracció de recombinació ( $\theta$ ) és una mesura de la dependència en l'herència entre dos *loci*, i s'aproxima a zero si aquests *loci* estan molt propers, o a 0,5 si els *loci* estan molt allunyats o en cromosomes diferents, de manera que s'hereten de forma independent. Una fracció de recombinació de 0,01 correspon aproximadament a una distància genètica d'1 cM que s'aproxima 0,9 Mb en el mapa físic (Gyapay et al., 1994).

Per calcular el grau de lligament entre dos *loci*, que poden ser un marcador polimòrfic i el gen responsable d'una malaltia, s'aplica un test de probabilitats. El LOD score (logaritme de probabilitats) és el logaritme del quocient entre la probabilitat que dos *loci* estiguin lligats a una determinada distància genètica  $\theta$ , i la probabilitat que no ho estiguin ( $\theta=0,5$ ) (Morton, 1995).

$$Z(\theta) = \log_{10} \frac{L(\theta)}{L(0,5)}$$

Lander i Kruglyak van proposar els estàndards per a la interpretació dels resultats de lligament (Lander i Kruglyak, 1995). Van determinar que el llindar de significació pels cribratges genòmics amb  $p=0,05$  s'aconseguia a un valor de  $p=4,9 \times 10^{-5}$ , sent el LOD score corresponent de 3,3. També van establir els conceptes 'lligament suggestiu' ( $p \leq 1,7 \times 10^{-3}$ ;  $\text{LOD} \geq 1,86$ ), i 'lligament nominal' ( $p \leq 0,05$ ;  $\text{LOD} \geq 0,5875$ ) (Lander i Kruglyak, 1995; Nyholt et al., 2000).

Hi ha dos mètodes d'anàlisi de lligament, el paramètric, en què cal assumir un determinat tipus d'herència del trastorn a la família o famílies en estudi, i el no paramètric, en què no s'assumeix cap tipus d'herència i que es basa simplement en la mesura de l'increment de la freqüència amb què determinats segments cromosomòmics són compartits entre els individus afectats. En un principi els mètodes no paramètrics es limitaven als estudis basats en parelles de germans afectats (*sib pair analysis*), però s'han anat desenvolupant programes per analitzar els al·lels compartits per individus amb un grau de parentesc més llunyà. Entre els programes informàtics més utilitzats hi ha el GENEHUNTER, l'ALLEGRO, el SOLAR i el MERLIN, eines molt potents que en alguns casos també són útils per identificar *loci* que influeixen en trets quantitius (Kruglyak et al., 1996; Kong i Cox, 1997; Almasy i Blangero, 1998; Gudbjartsson et al., 2000). Aquests programes tenen tot sovint limitacions en la potència de càlcul quan es processen famílies molt extenses, que es poden pal·liar descartant individus poc informatius o bé fragmentant la genealogia i processant-la per parts, amb la conseqüent pèrdua d'informació.

Donat que els mètodes no paramètrics no exigeixen especificació del model d'herència, sovint es consideren els més adequats per a l'estudi de malalties que, tot i ser monogèniques, presenten algunes característiques pròpies de les malalties complexes, com la penetració incompleta o una taxa elevada de fenocòpies, que emmascaren el mode d'herència. No obstant, tenen l'inconvenient que la seva potència és en general més baixa que la dels mètodes

paramètrics (Abreu et al., 1999). L'anàlisi paramètrica permet jugar amb diferents paràmetres genètics, com el grau de penetració o la presència de fenocòpies. Tot i així, alguns autors han indicat que en moltes situacions els mètodes paramètrics i no paramètrics són estadísticament equivalents ja que en els mètodes paramètrics a vegades són necessàries assumpcions de tota mena per reduir la complexitat de les dades (Goring i Terwilliger, 2000; Hodge, 2001).

#### 4.1.4.2 Estudis d'associació

Els estudis d'associació són probablement l'eina més adequada per a l'anàlisi de les malalties complexes, causades per la interacció entre múltiples gens d'efecte menor i factors ambientals. Cadascun dels gens presentaria una o més variants polimòrfiques que, en determinades combinacions, donarien una determinada susceptibilitat al fenotip. L'objectiu de l'anàlisi d'associació és determinar si un tret fenotípic i un al·lel particular d'un polimorfisme co-ocorren sense que això sigui efecte de l'atzar (Ewens i Spielman, 2001). Si un al·lel augmenta el risc a patir una malaltia, esperem trobar-lo a més alta freqüència entre individus afectats que entre individus sans. La diferència es pot calcular comparant la distribució de freqüències d'al·lells o genotips observada en els casos i els controls utilitzant un test de  $X^2$  estàndard on les hipòtesis a avaluar són:  $H_0$ : l'al·lel té la mateixa freqüència en casos i controls i  $H_1$ : l'al·lel té una freqüència diferent en casos i controls. La significació estadística de l'associació es mesura utilitzant un valor de  $p$ , que es defineix com la probabilitat d'obtenir una diferència tan gran com l'observada entre els grups de casos i controls per un simple efecte de l'atzar. En altres paraules, és la probabilitat de rebutjar  $H_0$  quan aquesta és certa (error de tipus I o fals positiu). Si es realitza un sol test, un valor de  $p=0.05$  es considera significatiu. L'error de tipus II o fals negatiu (acceptar  $H_0$  quan és falsa) és la preocupació essencial en els estudis de replicació. Quan la probabilitat de cometre un error de tipus II és baixa, el poder de l'estudi (la probabilitat de rebutjar  $H_0$  quan efectivament és falsa), és molt alt. Un dels temes més discutits és com s'hauria de realitzar la correcció per a tests múltiples (molts marcadors genotipats i anàlisi de subgrups de pacients). La correcció per Bonferroni, que divideix el valor  $p$  establert pel número de proves realitzades és massa conservadora, ja que els marcadors genotipats i els fenotips estudiats no són totalment independents (Nyholt, 2001). La correcció per permutacions avalua empíricament la probabilitat d'obtenir un resultat en particular, per casualitat. En aquest mètode, la distribució pel test de  $X^2$  sota la  $H_0$  es defineix reordenant a l'atzar (permutant) l'estatus cas/control varies vegades a la bateria de dades (Hirschhorn i Daly, 2005). El resultat d'un únic estudi d'associació no es considera definitiu, ja que poden aparèixer associacions falses a causa d'una mida mostral insuficient o d'un grup control



pobrament aparellat amb el grup de casos (Cardon i Bell, 2001). Així doncs, són necessaris estudis de replicació.

### 4.2 IDENTIFICACIÓ DE GENS IMPLICATS EN MALALTIES COMPLEXES

#### 4.2.1 EL REPTA D'ESTUDIAR MALALTIES COMPLEXES

Es pot pensar en les malalties humanes com a un espectre continu que s'estén des de les malalties majoritàriament genètiques fins a aquelles que són principalment mediambientals o fins i tot accidentals. Les malalties amb herència complexa (o multifactorial), causades per la interacció entre factors genètics i ambientals, estarien situades en algun lloc enmig d'aquest continuum. L'heterogeneïtat al·lèlica (en què la malaltia pot estar causada per diferents variants dins del mateix gen) i l'heterogeneïtat de *locus* (una mateixa malaltia pot ser el resultat de variants en diferents gens situats en *loci* cromosòmics diferents) poden complicar l'anàlisi de malalties monogèniques i complexes. En malalties multifactorials, la complexitat genètica pot augmentar encara més en situacions en què, per exemple, múltiples al·lells tenen un efecte additiu (el fenotip es manifesta quan s'arriba a un determinat llindar) o quan hi ha un gen essencial i gens modificadors addicionals que conjuntament causen el fenotip. Aquesta interacció entre gens, on l'efecte d'un gen és alterat o emmascarat per un altre gen, s'anomena epistasi, i el tractament estadístic requereix un gran esforç (Cordell, 2002).

A més, hi ha l'efecte de l'ambient. Els estudis de bessons revelen que la contribució dels factors genètics a la susceptibilitat de malalties complexes està sovint per sota del 60% (Boomsma et al., 2002), dada que confereix un paper molt significatiu als factors ambientals i augmenta encara més la complexitat de l'estudi. Altres inconvenients a l'hora de cercar gens de susceptibilitat són factors com les fenocòpies o genocòpies, individus que expressen el mateix fenotip que d'altres individus afectats però no comparteixen la base genètica causant de la malaltia, i l'expressivitat variable del fenotip que es dona fins i tot entre individus d'una mateixa família (Thornton-Wells et al., 2004). La migranya és un bon exemple de tots aquests factors que dificulten l'estudi: pot presentar formes monogèniques o complexes, compta amb un elevat percentatge de fenocòpies ja que és una malaltia molt prevalent, presenta una gran variabilitat en l'expressió fenotípica, hi ha penetració incompleta i molt probablement, és el resultat de la interacció de gens amb diferents factors ambientals.

La dificultat principal en la identificació de factors genètics de susceptibilitat a una malaltia complexa és, tanmateix, el fet que una variant individual en la majoria dels casos només tindrà

un efecte molt petit sobre el risc global de l'individu a patir la malaltia. Per superar aquest problema s'han ideat diversos dissenys experimentals, però la conveniència i l'èxit d'aquests depèn en gran mesura d'assumpcions apriorístiques que no sabem si són certes o no, com ara el número de gens implicats, la freqüència dels al·lels de risc i la magnitud de l'efecte que aquests al·lels tenen sobre el risc. La hipòtesi 'malaltia comú - variant comú' suggereix que al·lels relativament comuns amb un efecte dèbil predisposen a la malaltia i que cada *locus* conté només un o uns quants d'aquests al·lels (Lander, 1996; Cargill et al., 1999; Reich i Lander, 2001). Un punt de vista alternatiu és que l'estructura al·lèlica de les malalties complexes s'assembla a l'observada en malalties monogèniques, múltiples al·lels rars amb efectes de moderat a gran (Terwilliger i Weiss, 1998). La majoria dels al·lels identificats associats a malalties comunes tendeixen a donar suport a la hipòtesi de 'malaltia comú - variant comú', però això podria ser degut a que aquests gens són més fàcils d'identificar (Lohmueller et al., 2003).

Una altre qüestió en debat és el tipus de variacions de seqüència causals que hauríem d'esperar trobar darrere d'una malaltia complexa. Normalment s'havien buscat variacions situades a les seqüències dels gens que codifiquen per proteïna (cSNPs), però estudis recents han identificat variants causals o com a mínim fortament associades a la patologia, a les regions reguladores (Enattah et al., 2002; Pajukanta et al., 2004). Del gran nombre d'SNPs localitzats dins de les regions genòmiques no transcrits, aquells més conservats en l'evolució (i per tant potencialment més importants per a la funció) són els que tindrien més probabilitat d'estar associats a la malaltia (Dermitzakis et al., 2005). La informació proporcionada pels mètodes genòmics comparatius es pot utilitzar per seleccionar i prioritzar aquests SNPs, encara que val la pena mencionar que la majoria dels cSNPs identificats associats a malalties complexes afecten a aminoàcids molt menys conservats que els que causen malalties mendelianes, i per tant és probable que provoquin efectes més lleus sobre la funció de la proteïna (Thomas i Kejariwal, 2004).

#### **4.2.2 DISSENY D'ESTUDIS PER IDENTIFICAR VARIANTS DE SUSCEPTIBILITAT A LA MALALTIA**

##### **4.2.2.1 Estratègia dels gens candidats**

Sempre es fa sota una determinada hipòtesi. Els gens se seleccionen en base a la seva localització en una regió de susceptibilitat prèviament identificada (candidats posicionals) o perquè hi ha evidències d'una possible connexió amb la malaltia (candidats funcionals) (Tabor et al., 2002). El desavantatge principal d'aquest mètode és que en la majoria dels casos la fisiopatologia de la malaltia encara és relativament desconeguda, i la selecció del gen

candidat més probable entre els presumptament 20.000-25.000 gens humans existents (*International Human Genome Sequencing Consortium 2004*) pot ser extremadament difícil. L'estudi d'associació basat en un disseny cas-control poblacional utilitzant múltiples SNPs que cobreixen el gen o gens d'interès ha estat el més comú en els estudis de gens candidats, encara que també seria possible fer aquest tipus d'estudi basat en famílies.

### **4.2.2.2 Cribratges genòmics**

L'objectiu d'aquest tipus d'estudi és localitzar el gen de la malaltia establint una evidència estadísticament significativa de lligament o associació. Com que es cribra el genoma sencer, a priori no es requereix cap coneixement sobre la localització o funció del gen responsable. L'èxit en la identificació de gens implicats en malalties complexes a través d'un anàlisi de lligament és limitat. Els senyals sovint són dèbils i incoherents: menys d'un terç dels cribratges publicats fins l'any 2000 mostraven evidència significativa de lligament (Altmuller et al., 2001). Tanmateix, això podria ser conseqüència de l'ús de mapes de marcadors massa espaiats, i de fet s'ha demostrat que el re-genotipat dens de les mostres existents poden afegir una quantitat d'informació extra considerable (Sawcer et al., 2004). L'anàlisi de lligament té menys força (uns 3 cops menys) que l'anàlisi d'associació a l'hora de detectar variants genètiques comuns amb efectes modestos sobre el risc de patir la malaltia (Risch i Merikangas, 1996; Risch, 2000) i sol identificar regions de susceptibilitat més amples, que normalment excedeixen els 10 cM (Glazier et al., 2002), però d'altra banda té un clar avantatge sobre l'estudi d'associació: no es veu afectat per l'heterogeneïtat al·lèlica. Probablement, la combinació de les dues estratègies sigui una bona solució.

Els primers estudis d'associació genòmics es van limitar a poblacions aïllades en les quals el desequilibri de lligament pot detectar-se sobre grans distàncies utilitzant marcadors microsatèl·lits (Ophoff et al., 2002). La proposta d'utilitzar SNPs pel cribratge d'associació genòmic es feia per primer cop l'any 1996 (Risch i Merikangas, 1996), i el potencial d'aquest mètode s'ha avaluat en uns quants estudis durant aquesta primera dècada, fins que la seva implantació s'ha disparat en els dos darrers anys gràcies a l'adveniment de noves tècniques de genotipació i magnífics mètodes d'anàlisi. Malgrat l'aparent eficàcia d'aquesta metodologia, encara no s'han observat avenços espectaculars ni consistents en la detecció de variants de susceptibilitat (Terwilliger i Weiss, 1998; Slager et al., 2000; Weiss i Terwilliger, 2000).

Com s'estima el número d'SNPs que cal genotipar en un estudi d'associació genòmic? Actualment, la genotipació de milions d'SNPs és tècnicament factible, i poc a poc ho va sent

també a nivell econòmic. A més, l'esforç dedicat al desenvolupament de programes per tractar aquest volum d'informació, intuitius per a l'usuari, avança a grans passes, de manera que els factors limitants en aquests moments semblen ser la qualitat de la mostra en quant a la correcta identificació i caracterització dels pacients i correcta recolecció, concentració i preparació del DNA, els problemes estadístics derivats dels múltiples tests comparatius (falsos negatius i falsos positius) i la utilització de SNPs redundants (en desequilibri de lligament) que penalitzen l'estadística.

Els múltiples tests en mostres modestes poden produir fàcilment un 5% d'associacions significatives per atzar, i la publicació preferencial dels resultats positius agreuja aquests efectes. Fins i tot quan l'associació és real, hi ha tendència a sobreestimar l'efecte genètic (Ioannidis et al., 2001). També es poden donar falsos negatius pel fet d'agrupar en una mostra de diagnòstic difícil un fenotip lleugerament diferent.

A la fi, independentment del mètode utilitzat per a la identificació de la variant de risc, són els estudis funcionals els que proporcionen l'evidència concloent de la relació causal entre aquesta variant i la malaltia. Es pot estudiar l'efecte de la variant en l'expressió gènica o en la funció de la proteïna mitjançant sistemes *in vitro*, encara que molts dels efectes depenen en gran mesura de context i només poden apreciar-se en determinats tipus cel·lulars i sota determinades condicions experimentals, i són difícils d'interpretar. La producció d'animals transgènics amb un fenotip similar al dels humans probablement és l'evidència més convincent encara que els efectes són encara més difícils d'interpretar (Glazier et al., 2002).

#### 4.2.3 PROBLEMES

Una situació típica en el camp de les malalties complexes és que per a qualsevol tret particular s'han realitzat unes quantes anàlisis de lligament a nivell genòmic però la majoria dels *loci* identificats tenen poc suport estadístic i es troben només en un estudi. El número de *loci* replicats és molt baix i només en alguns casos s'ha identificat el gen i la variant en qüestió, responsable del fenotip.

Què podem fer per augmentar les possibilitats d'identificar factors genètics de risc per a malalties complexes?

## 4.2.4 SOLUCIONS

### 4.2.4.1 Models monogènics de la malaltia

Gran part del progrés en l'estudi de les malalties complexes s'ha obtingut a través de l'estudi de variants monogèniques i poc freqüents de la malaltia d'interès. Les formes monogèniques són sovint més severes i/o tenen un inici de la malaltia més precoç que les seves homòlogues complexes. La hipòtesi és que variants polimòrfiques en els gens responsables de les formes monogèniques podrien contribuir a la susceptibilitat a les formes més comuns de la malaltia. En efecte, en alguns casos en què aquests gens s'han utilitzat com a gens candidats en estudis d'associació de tipus cas-control, el resultat ha estat exitós, com és el cas del gen *COL1A1*, responsable de l'osteogènesi imperfecta (malaltia monogènica) i implicat també en l'osteoporosi (malaltia multifactorial) (Kuivaniemi et al., 1991; Dalglish, 1997), encara que no abunden els exemples.

### 4.2.4.2 Endofenotips

Un altre enfoc que pot permetre disminuir la complexitat genètica és fer ús dels fenotips intermediaris o endofenotips, que probablement en molts casos estan controlats per menys factors de susceptibilitat (cadascun) que el conjunt de malaltia (Bearden et al., 2004). El problema, però, és que sovint no s'han realitzat estudis d'heretabilitat per a ells. L'alternativa en els estudis d'associació podria ser centrar-se només en els fenotips més extrems, amb un fenotip sever, història familiar positiva i inici precoç.

### 4.2.4.3 Models animals

La identificació de *loci* responsables de trastorns en models animals, i l'assumpció que els seus ortòlegs humans també participen en un trastorn equivalent, és una bona aproximació per a reduir la complexitat de l'estudi, però sovint en les malalties complexes és difícil trobar un bon model animal, i més en aquelles malalties on no hi ha un marcador detectable per al diagnòstic i cal basar-se en el testimoni del pacient. Naturalment, els models animals tenen un ús molt limitat en malalties com la migranya on la diagnosi es basa en una entrevista clínica.

### 4.2.4.4 Poblacions aïllades

Les poblacions aïllades han demostrat ser ideals per a la identificació de gens que provoquen malalties monogèniques rares (Sheffield et al., 1998), i també en l'estudi de malalties complexes (Gulcher et al., 2001). La consanguinitat, la reduïda heterogeneïtat provocada per un nombre petit d'individus fundadors, els subsegüents colls d'ampolla, i l'efecte de la deriva genètica poden restringir el nombre d'al·lels de susceptibilitat presents en els individus

afectats. A més a més, bons registres genealògics, un ambient i estil de vida més uniforme i criteris de diagnosi més estandarditzats són avantatges obvis que també es donen en certs aïllaments poblacionals (Peltonen et al., 2000). Poblacions com les de Costa Rica, Terranova, i Finlàndia són especialment avantatjoses a les fases de mapatge inicial (Wright et al., 1999). L'inconvenient d'identificar variants de susceptibilitat en aquestes poblacions aïllades és que aquests al·lels no són necessàriament compartits per altres poblacions (però els gens sí), encara que normalment els efectes de les variants de risc són consistents tot i que les freqüències dels al·lels difereixin considerablement entre poblacions (Ioannidis et al., 2004).









# OBJECTIUS





### OBJECTIUS

---

El propòsit principal d'aquesta tesi ha estat avançar en el coneixement de les causes genètico-moleculares de les formes monogèniques de migranya. L'estratègia que hem seguit ha consistit en el mapatge del gen responsable de la malaltia en dues famílies autosòmiques dominants extenses d'origen català, amb individus amb migranya hemiplègica familiar (FHM) i/o migranya amb aura (MA) i migranya sense aura (MO), i la cerca i caracterització funcional de noves mutacions en gens prèviament relacionats amb FHM en pacients amb FHM, migranya basilar (BM), síndromes periòdiques de la infància (CPS) i atàxia episòdica de tipus 2 (EA2).

Els objectius específics han estat:

1. Cerca del *locus* que conté el gen responsable de la FHM en una família autosòmica dominant extensa mitjançant l'anàlisi de lligament a escala genòmica. Investigació *in silico* de la regió crítica acotada i anàlisi mutacional de gens candidats a la regió (Article 1).
2. Cerca del *locus* implicat en el fenotip MA en una segona família autosòmica dominant extensa mitjançant l'anàlisi de lligament a escala genòmica (Annex a l'article 1).
3. Cerca de mutacions en els gens *CACNA1A*, *ATP1A2* i *SCN1A*, prèviament descrits com a responsables de formes monogèniques de migranya, en individus no emparentats amb fenotips FHM, BM i CPS (Article 2).
4. Cerca de mutacions en el gen *CACNA1A* prèviament descrit com a responsable del fenotip EA2, en individus no emparentats amb aquest trastorn (Annex a l'article 2).
5. Estudi de la hipotèrmia episòdica com a entitat susceptible d'ésser considerada un nou equivalent migranyós a l'edat pediàtrica (Article 3).
6. Caracterització de la mutació p.Ala454Thr en el gen *CACNA1A*, identificada en individus MA d'una família amb membres que presenten FHM, MA i MO. Determinació de la importància funcional d'aquesta mutació i possible paper protector del desenvolupament de l'aura hemiplègica (Article 4).

