



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNeC)
Dottorato in Biomedicina e Neuroscienze, indirizzo "Fisiopatologia Neurosensoriale"
XXVI ciclo
Settore Scientifico Disciplinare: MED 26

Eccitabilità corticale e ciclo emicranico: studio condotto con stimolazione magnetica transcranica in pazienti affetti da emicrania con e senza aura ed emicrania cronica

DOTTORANDO
Dott. Giuseppe Cosentino

COORDINATORE
Prof. Giuseppe Ferraro

TUTOR
Prof.ssa Brigida Fierro

CICLO XXVI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

Ai miei cari genitori

A mia moglie Francesca

Alla mia piccola Carlotta

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto tutti i colleghi, specializzandi e interni, che nel corso di questi anni hanno dato un contributo fondamentale allo svolgimento del lavoro oggetto di questa tesi.

Un ringraziamento particolare va al professore Filippo Brighina, mio “mentore” scientifico e guida, per i preziosi consigli, gli insegnamenti, e soprattutto per l'esempio, che lui per me rappresenta, di quello che dovrebbe essere il vero ricercatore.

Un ultimo grazie va alla prof.ssa Brigida Fierro, altro mio “mentore” scientifico, per cui nutro grandissimo affetto e stima, e al professore Giuseppe Ferraro per la sua grande disponibilità e professionalità.

Indice

Premessa.....	6
---------------	---

Parte introduttiva

○ Dove nasce l'attacco di emicrania?.....	8
○ Qual è la reale natura dell'alterata eccitabilità corticale nell'emicrania?.....	10
○ Studi condotti con potenziali evocati: ipoattivazione corticale e iperresponsività.....	11
○ Ipereccitabilità corticale e tecniche di stimolazione cerebrale non invasiva.....	15
○ Stimolazione magnetica transcranica con singolo e doppio stimolo.....	16
○ Stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS).....	19
○ Ipoeccitabilità corticale nell'emicrania: il ruolo della plasticità omeostatica corticale.....	21
○ Conclusioni e ipotesi di modello fisiopatologico unitario per l'emicrania.....	24

Parte sperimentale

○ Introduzione.....	30
○ Metodi.....	32
▪ <i>Soggetti</i>	32
▪ <i>Procedure sperimentali</i>	35
▪ <i>Paradigma sperimentale e misurazioni</i>	36
▪ <i>Analisi statistica</i>	37
○ Risultati.....	39
○ Discussione.....	46
▪ <i>Risposte motorie corticali in pazienti con emicrania episodica in fase interictale</i>	46
▪ <i>Eccitabilità corticale motoria durante il ciclo emicranico in pazienti con emicrania episodica</i>	49

- *Risposta motoria corticale in pazienti con emicrania cronica*.....51
- Conclusioni e considerazioni finali.....54
- Riferimenti bibliografici.....55

Premessa

L'emicrania è un disturbo neurologico idiopatico, con decorso cronico. Nella maggior parte dei pazienti si manifesta con attacchi ricorrenti di cefalea, spesso severa e inabilitante, variamente associata a disturbi neurovegetativi e neurologici. In un sottogruppo ristretto ma rilevante di soggetti il quadro evolve nel tempo da forme episodiche a forme croniche estremamente invalidanti, caratterizzate da cefalea anche a frequenza quotidiana.

Con le sue diverse entità cliniche, l'emicrania rientra nel capitolo delle cefalee primarie, ossia di quelle forme in cui il mal di testa si presenta anche per molti anni o decenni senza che nessuna causa organica possa essere identificata.

Tutti gli aspetti che determinano la qualità di vita (fisici, funzionali, emozionali, intellettuali e sociali) sono sensibilmente deteriorati dall'emicrania. È stato dimostrato che questa compromissione può essere uguale o addirittura superiore a quella causata da altre malattie croniche usualmente considerate più invalidanti, come l'osteoartrite o il diabete mellito. Inoltre, essendo più comune negli anni di maggiore produttività lavorativa (25-55 anni), l'emicrania è causa di un rilevante danno socioeconomico, i cui costi indiretti (es. perdita di ore sul posto di lavoro, riduzione qualitativa e quantitativa delle capacità lavorative) superano di gran lunga quelli diretti (es. spese per diagnosi e cura).

Nonostante tutto l'emicrania resta ad oggi una delle patologie neurologiche meno curate, tanto che oltre la metà di coloro che ne soffrono non ha mai consultato un medico o, se lo ha fatto, non ha ricevuto una diagnosi appropriata.

Soffrire di emicrania non è una cosa "normale" e oggi studi che hanno svelato alcuni dei meccanismi patogenetici degli attacchi hanno permesso di sviluppare una grande varietà di farmaci in grado di ridurre durata, frequenza ed intensità delle crisi emicraniche.

Pertanto, in tutti coloro che soffrono di cefalea, sarebbe necessario porre una diagnosi corretta in modo da garantire innanzitutto che quel numero ristretto di pazienti con patologie organiche venga identificato e trattato appropriatamente. Nella maggioranza dei casi, dopo un esame clinico ed opportune indagini strumentali, non si evidenziano condizioni patologiche sottostanti, e in base alle caratteristiche del dolore si può fare diagnosi di emicrania o di cefalea di tipo tensivo, che rappresentano le due forme di cefalea primaria di gran lunga più frequenti.

Nella presente tesi, in una prima parte introduttiva verranno discussi in maniera critica i principali risultati di studi diversi, soprattutto neurofisiologici, volti alla comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base del disturbo. Sarà inoltre ipotizzato un modello fisiopatologico che potrebbe essere in grado di riunire in un quadro unico i risultati di studi spesso apparentemente conflittuali.

Nella sessione sperimentale saranno invece presentati e discussi i risultati di uno studio condotto in pazienti affetti da emicrania episodica e cronica con lo scopo di ottenere informazioni sui meccanismi fisiopatologici alla base della ricorrenza degli attacchi (in pazienti con emicrania episodica) e alla base della “trasformazione” dell’emicrania, ovvero dell’evoluzione da forme di emicrania episodica a bassa frequenza di attacchi a forme con frequenza di attacchi sempre più elevata fino all’emicrania cronica.

Parte introduttiva

Dove nasce l'attacco di emicrania?

Ad oggi, la maggior parte degli autori concorda sul fatto che la suscettibilità a sviluppare attacchi di emicrania dipende principalmente dalla disfunzione di meccanismi di regolazione dell'eccitabilità corticale, ovvero di quei meccanismi che regolano le modalità attraverso le quali il sistema nervoso centrale risponde ad un gran numero di stimoli sia esogeni che endogeni. In pazienti affetti da emicrania l'eccitabilità di diverse aree corticali è stata studiata in maniera estensiva utilizzando tecniche diverse come i potenziali evocati (EP) multimodali, o la stimolazione cerebrale non invasiva, in particolare la stimolazione magnetica transcranica (TMS) e la stimolazione transcranica con correnti continue (tDCS). In accordo con la teoria del sistema trigemino-vascolare formulata per la prima volta da Moskowitz nel 1989, la cefalea emicrania è legata all'attivazione di fibre trigeminali perivascolari, che convogliano informazioni nocicettive al tronco e quindi alle altre strutture del sistema nervoso centrale (Olesen et al., 2009). Restano tuttavia controversi i meccanismi responsabili dell'attivazione del sistema trigemino-vascolare da parte di un gran numero di fattori "triggers", ovvero scatenanti, dell'attacco emicranico.

Alcune evidenze suggeriscono come l'attacco emicranico possa originare a livello della corteccia cerebrale. Innanzitutto, sintomi prodromici come irritabilità, fotofobia, fonofobia e osmofobia suggeriscono come un diffuso aumento di responsività corticale precede la fase algica (Rossi et al., 2005; Andreatta et al., 2012). Inoltre, bisogna considerare che diversi fattori in grado di modificare l'eccitabilità corticale (es. ciclo mestruale e ciclo sonno-veglia) possono modificare

la suscettibilità a sviluppare un attacco di emicrania in soggetti predisposti (Welch et al., 2003). Ancora vi è evidenza sperimentale che onde di depolarizzazione corticale a livello della corteccia occipitale visiva (cortical spreading depression, CSD), che rappresentano il correlato fisiopatologico dell'aura emicranica, possono attivare il sistema trigemino-vascolare (Bolay, 2012). Non per ultimo, alcuni studi neurofisiologici hanno dimostrato come variazioni di eccitabilità corticale possono precedere l'inizio dell'attacco emicranico (Sand et al., 2008; Siniatchkin et al., 2009; Cosentino et al., 2014).

Tuttavia i meccanismi patogenetici attraverso cui modificazioni dell'eccitabilità corticale potrebbero attivare il sistema trigemino-vascolare restano da chiarire, così come resta da comprendere il ruolo giocato da strutture sottocorticali come il tronco encefalo, il talamo, e l'ipotalamo, che sono tutte bidirezionalmente connesse con la corteccia cerebrale, sia direttamente che indirettamente.

Modelli animali sperimentali di CSD mostrano come le diverse sostanze vasoattive e nocicettive rilasciate a livello del parenchima cerebrale durante la CSD possono diffondere nel comparto extracellulare fino a raggiungere ed attivare le fibre trigeminali (Bolay et al., 2002; Obrenovitch et al., 2002; Bolay, 2012). Un meccanismo patogenetico di questo tipo si riferisce primariamente agli attacchi di emicrania con aura. Infatti, sebbene sia stato ipotizzato che onde di CSD potrebbero manifestarsi anche in pazienti affetti da emicrania senza aura, a livello di aree corticali clinicamente "silenti", non vi sono chiare evidenze in tal senso (Chakravarty, 2010). Nonostante ciò, si potrebbe anche ipotizzare che nell'emicrania senza aura, anche senza considerare la possibile esistenza di CSD silenti, stimoli diversi, agendo su una corteccia globalmente ipereccitabile, potrebbero comunque determinare uno stato di iper-attivazione in grado di determinare cambiamenti metabolici parenchimali capaci di scatenare l'attacco.

Qual è la reale natura dell'alterata eccitabilità corticale nell'emicrania?

Il paziente emicranico si caratterizza per una aumentata responsività cerebrale a diversi fattori ambientali. Tale condizione di iperresponsività è presente non solo durante l'attacco ma anche nei periodi interictali. Gli emicranici sono più sensibili a stimoli visivi e acustici rispetto ai soggetti non emicranici (Main et al., 1997).

Inoltre, la soglia per il "discomfort" visivo e acustico è ridotta nei pazienti emicranici in fase intercritica e si riduce ulteriormente durante la fase critica (Woodhouse e Drummond, 2003; Vingen et al., 1998). Lo stato di aumentata eccitabilità corticale interessa non solo le cortecce sensoriali, ma anche le aree motorie (Brighina et al., 2005; Siniatchkin et al., 2007; Cosentino et al., 2011) e le strutture implicate nell'elaborazione di informazioni cognitive (Kropp e Gerber, 1995) e di carattere emotivo-affettivo (Andreatta et al., 2012). La comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base dell'iperresponsività corticale emicranica ha rappresentato e rappresenta tutt'oggi una sfida per i ricercatori. Alcuni autori hanno fornito evidenza di una ridotta preattivazione corticale da parte di strutture sottocorticali quali ad es. i nuclei aminergici del tronco (Coppola et al., 2007a, 2009). Altri ricercatori hanno invece attribuito la condizione di ipereccitabilità corticale ad una disfunzione glutammatergica (Aurora et al., 1998; Brighina et al., 2011; Siniatchkin et al., 2012) ovvero ad una compromissione di circuiti intracorticali inibitori (Aurora et al., 1999a; Mulleners et al., 2001; Chadaide et al., 2007). Come discusso in seguito, i dati a favore di ipotesi patogenetiche diverse non sono necessariamente conflittuali, potendo di fatto rappresentare aspetti diversi di un unico, complesso quadro di alterata eccitabilità corticale.

Studi condotti con potenziali evocati: ipoattivazione corticale e iperresponsività.

Numerosi studi di potenziali evocati con diverse modalità sensoriali hanno dimostrato, in pazienti affetti da emicrania episodica con e senza aura, sia una ridotta ampiezza di risposte precoci che un deficit di “abituazione”, consistente nella mancata riduzione di ampiezza delle risposte evocate che si osserva nei soggetti sani nel corso di treni di stimoli ripetuti.

Ampiezze più basse delle risposte evocate durante il primo treno di stimoli sono state registrate a seguito di stimoli visivi (Afra et al., 1998a, 2000), uditivi (Ambrosini et al., 2003) e somato-sensitivi (Ozkul and Uckardes, 2002), così come per riflessi tronco-encefalici (Di Clemente et al., 2007). Queste sono state interpretate come espressione di ridotta preattivazione corticale da parte di strutture sottocorticali. Infatti, anche se in senso stretto i potenziali evocati valutano la responsività corticale, si ritiene che stimolazioni ripetitive a bassa intensità, durante i primi stimoli, potrebbero dare informazioni sul livello basale di attivazione corticale. Altri studi di potenziali evocati visivi (Coppola et al., 2007b) e somato-sensitivi (Coppola et al., 2005) condotti con l’analisi delle oscillazioni ad alta frequenza (HFO), così come studi PET sul metabolismo cerebrale della serotonina (Hamel et al., 2007), hanno fornito dati a supporto dell’esistenza di un ridotto stato di preattivazione corticale nell’emicrania.

Il deficit di abituazione di potenziali evocati è stato descritto in studi di potenziali visivi, uditivi, somato-sensitivi e cognitivi (Brighina et al., 2009; Coppola et al., 2009), ed inoltre è stato osservato a seguito di stimoli nocicettivi ripetitivi (De Tommaso, 2008) e in riflessi di tronco come il Blink reflex (De Marinis et al., 2003).

L'abituazione può essere definita come una risposta decrementale a stimolazioni ripetitive ed è considerata un meccanismo fondamentale per il corretto funzionamento dei circuiti neuronali (Thompson e Spencer, 1966). Nell'emicrania il deficit di abituazione può essere responsabile di una alterazione dei meccanismi di elaborazione di differenti tipi di stimoli, ed è considerato come un correlato fisiopatologico fondamentale dell'iperresponsività corticale. Nonostante ciò, le basi fisiopatologiche del deficit di abituazione restano controverse. Alcuni autori hanno ipotizzato come il deficit di abituazione potrebbe essere conseguenza di una ridotta attivazione della corteccia da parte di strutture sottocorticali come il talamo e i nuclei aminergici del tronco. Questa condizione potrebbe spiegare le basse ampiezze delle risposte evocate durante la prima serie di stimoli ripetitivi, che a sua volta potrebbe essere responsabile del mancato raggiungimento di un valore soglia di attivazione corticale necessario per l'induzione dell'abituazione (Schoenen, 1996; Coppola et al. 2007a, 2009). In alternativa, il deficit di abituazione potrebbe essere considerato come un'espressione primitiva di iperresponsività corticale. In tal caso la "down-regulation" del talamo e dei nuclei troncali potrebbe essere considerata come un meccanismo compensatorio (nei confronti dell'iperresponsività corticale) mediato da circuiti a feed-back cortico-sottocorticali (Shin e Chapin, 1989, 1990). Questa interpretazione è in linea con l'evidenza che in soggetti sani la deprivazione visiva, che determina un incremento di eccitabilità della corteccia visiva (Boroojerdi et al., 2000), porta ad un deficit di abituazione durante potenziali evocati visivi (Palermo et al., 2011).

I dati di alcuni studi condotti con potenziali evocati con l'utilizzo di differenti parametri di stimolazione (es. intensità, frequenza e durata della stimolazione) potrebbero fornire informazioni importanti al fine di chiarire la natura del deficit di abituazione osservato nell'emicrania. Innanzitutto, studi condotti con potenziali

evocati uditivi hanno mostrato che, nell'emicrania, l'aumento dell'intensità di stimolazione acustica porta ad una normalizzazione dell'ampiezza delle prime risposte evocate, senza che tuttavia il normale pattern di abituação venga ripristinato (Wang et al., 1996; Afra et al., 2000; Ambrosini et al., 2003). Questo dato sembra indicare che il deficit di abituação nell'emicrania non può essere attribuito semplicemente alla presenza di più basse ampiezze iniziali, ma piuttosto potrebbe essere esso stesso espressione di uno stato di aumentata responsività corticale. Questa interpretazione è ulteriormente supportata dal dato di Siniatchkin et al. (2012), che mostra come il deficit di abituação può essere osservato nell'emicrania anche in presenza di risposte iniziali di ampiezza maggiore.

Alcuni autori non hanno trovato, nell'emicrania, ampiezze più basse per quanto riguarda le risposte evocate dal primo treno di stimoli ripetuti. Questo potrebbe dipendere da differenze metodologiche tra studi diversi, inerenti in modo particolare parametri quali intensità, durata e frequenza della stimolazione, da cui dipende il livello complessivo di attivazione cerebrale in risposta agli stimoli esterni. Per fare un esempio, Sand e Vingen (2000) non hanno trovato potenziali evocati acustici di ridotta ampiezza iniziale pur avendo utilizzato la stessa intensità di stimolazione di Ambrosini et al. (2003) che invece aveva riportato tale dato.

Questa discrepanza potrebbe dipendere dal diverso numero di risposte registrate per ognuno dei treni di stimoli dati in successione, e di cui successivamente veniva calcolata l'ampiezza media. Infatti Sand e Vingen (2000) calcolavano il valore medio di un maggior numero di risposte iniziali rispetto ad Ambrosini et al. (2003), ed è ipotizzabile che solo con una più stretta finestra temporale di analisi è possibile evidenziare un basso livello di preattivazione corticale. Infatti una stimolazione più prolungata potrebbe determinare un aumento dello stato di attivazione corticale sufficiente a "controbilanciare" lo stato di ridotta preattivazione.

Per quanto riguarda il ruolo della frequenza di stimolazione, bisogna ricordare che diversi studi di potenziali evocati visivi condotti con una frequenza di stimolazione di 1-2 Hz non hanno messo in evidenza il caratteristico deficit di abituazione nell'emicrania (Oelkers et al., 1999, 2005; Khalil et al., 2000). Questo potrebbe essere legato all'utilizzo di una frequenza di stimolazione troppo bassa, non sufficiente ad elicitare una iperresponsività corticale. Infatti, la maggior parte degli autori hanno osservato la mancanza di abituazione di potenziali evocati visivi utilizzando una più alta frequenza di stimolazione pari a 3 Hz (Schoenen et al., 1995; Afra et al., 1998a, 2000; Sándor et al., 1999; Wang et al., 1999; Bohotin et al., 2002).

Infine, vi è evidenza che uno stato di aumentata responsività corticale non necessariamente si accompagna a deficit di abituazione. Infatti, l'abituazione durante stimoli ripetitivi può venire ripristinata in pazienti emicranici durante il periodo ictale (Evers et al., 1999; Judit et al., 2000; Siniatchkin et al., 2000), quando si ipotizza che un incremento di attività corticale possa essere alla base dello scatenamento di un attacco. Alcuni autori hanno spiegato tale fenomeno come possibile espressione di un'aumentata attività talamo-corticale fino al raggiungimento di una soglia critica di attivazione in grado di indurre l'abituazione (Coppola et al., 2007). Come spiegazione alternativa, se consideriamo il deficit di abituazione come espressione primaria di iperresponsività corticale, potremmo ipotizzare che nel periodo ictale lo stato di eccitabilità corticale potrebbe raggiungere un valore soglia per l'attivazione di meccanismi omeostatici in grado di inibire la risposta corticale a stimoli di diversa natura. Tali meccanismi inibitori omeostatici potrebbero, pertanto, portare ad una normalizzazione della responsività corticale e permettere il ripristino dell'abituazione (Cosentino et al., 2014). Questa interpretazione è in accordo con il dato che in soggetti sani, il deficit

di abitudine indotto dalla deprivazione visiva (che ricordiamo incrementa il livello di eccitabilità corticale) può essere normalizzato dalla stimolazione magnetica transcranica ad alta frequenza (Palermo et al., 2011). Quest'ultima una metodica di stimolazione cerebrale non invasiva è in grado di aumentare ulteriormente il livello di attivazione corticale e quindi potrebbe indurre, in linea con le regole della plasticità omeostatica (vedi in seguito), meccanismi inibitori in grado di "down-regolare" l'eccitabilità corticale.

Ipereccitabilità corticale e tecniche di stimolazione cerebrale non invasiva

Il concetto di ipereccitabilità corticale emicranica è prevalentemente frutto di studi condotti con tecniche di stimolazione cerebrale non invasiva. In particolare, la stimolazione magnetica transcranica (TMS) è stata utilizzata in un gran numero di studi per valutare l'eccitabilità corticale e la funzionalità di circuiti intracorticali eccitatori e inibitori (Brighina et al., 2013). La TMS è una metodica che consiste nell'applicazione di stimoli magnetici sulla superficie di diverse aree cerebrali (Terao e Ugawa, 2002). Con l'utilizzo di protocolli di studio che fanno uso di diversi parametri (es. numero di stimoli, frequenza e intensità della stimolazione, pattern di stimolazione) è possibile studiare aspetti diversi della funzione cerebrale (Hoogendam et al., 2010). Esiste evidenza sperimentale che anche un singolo stimolo magnetico è in grado di indurre la massiva depolarizzazione di un consistente numero di cellule neuronali sia inibitorie che eccitatorie a livello corticale (Chen, 2000; Hallett, 2007). Pertanto si ritiene come tutti i paradigmi di TMS valutino prevalentemente l'eccitabilità corticale, piuttosto che il livello di preattivazione corticale. La maggior parte degli studi TMS condotti nell'emicrania, così come in soggetti sani e in altre condizioni patologiche, riguarda le aree corticali visiva e motoria. Questo poiché la stimolazione di queste regioni evoca

risposte dirette (rispettivamente fosfeni e potenziali motori) i cui parametri sono facile da misurare.

Stimolazione magnetica transcranica con singolo e doppio stimolo

La TMS con singolo stimolo può essere utilizzata per esplorare l'eccitabilità della corteccia motoria misurando la soglia motoria a riposo (resting motor threshold, RMT) e l'incremento di ampiezza del potenziale evocato motorio che si verifica con il progressivo aumento dell'intensità di stimolazione (curve intensità-risposta). Per RMT si intende l'intensità di stimolazione minima in grado di indurre una risposta motoria registrabile dal muscolo target. Sebbene la maggior parte degli studiosi non abbia messo in evidenza differenze nei valori di RMT tra pazienti emicranici e soggetti sani (Werhahn et al., 2000; Brighina et al., 2002; Bohotin et al., 2003; Gunaydin et al., 2006), altri autori hanno registrato valori di RMT più bassi (Van der Kamp et al., 1996; Khedr et al., 2006) o più alti (Maertens de Noordhout et al., 1992; Schoenen et al. 2003) nei pazienti emicranici. Su questa base si può desumere che la RMT non rappresenta nell'emicrania una misura sensibile di modificazioni di eccitabilità corticale, dal momento che non è possibile mettere in evidenza né uno stato di ipoattivazione né uno di iperresponsività. Le curve intensità-risposta hanno una sensibilità maggiore rispetto alla RMT nello svelare differenze di eccitabilità corticale, grazie alla loro capacità di indurre una attivazione riverberante di una più ampia popolazione neuronale (Chen, 2000; Hallett, 2007). Infatti l'aumento progressivo di ampiezza del potenziale evocato motorio (MEP) che si osserva con l'aumento dell'intensità di stimolazione si ipotizza rifletta il progressivo reclutamento di un più estesi circuiti intracorticali eccitatori, con un incremento del numero di onde indirette di attivazione trans-sinaptica delle cellule piramidali che originano il tratto cortico-spinale (Rothwell,

1997; Chen, 2000; Boroojerdi et al., 2001). In un nostro studio (Cosentino et al., 2011) è stata osservata una pendenza più ripida delle curve intensità-risposta in pazienti con emicrania con aura rispetto ai soggetti sani, in accordo con il dato di Khedr et al. (2006) che ha mostrato un più rapido incremento di ampiezza del MEP in pazienti con emicrania sia con che senza aura. Questi dati suggeriscono che una condizione di ipereccitabilità corticale può essere messa in evidenza nell'emicrania soltanto utilizzando una sufficientemente elevata intensità di stimolazione. In particolare si può ipotizzare che a più alte intensità di stimolazione, l'attivazione riverberante di circuiti intracorticali facilitatori potrebbe permettere più facilmente di mettere in evidenza l'iperresponsività degli stessi.

La TMS con doppio stimolo permette di studiare l'attività di circuiti intracorticali facilitatori e inibitori a livello dell'area motoria (Ziemann et al., 1996; Hallett, 2007). In questi studi si utilizza uno stimolo "condizionante" che modula l'ampiezza del MEP prodotto dallo stimolo test. A intervalli molto brevi, inferiori a 5 ms, si registra una inibizione del MEP (short intracortical inhibition, SICI), mentre a intervalli inter-stimolo compresi tra 8 e 30 sec si ha facilitazione (short intracortical facilitation, ICF). La SICI dipende in larga misura dall'attività di circuiti GABAergici (Di Lazzaro et al., 2000), mentre l'ICF si pensa sia mediata da circuiti glutammatergici (Ziemann et al., 1996). Siniatchkin et al. (2007) hanno evidenziato una ICF aumentata in pazienti emicranici rispetto a soggetti sani di controllo, mentre altri autori non hanno trovato tale differenza (Afra et al., 1998b; Werhahn et al., 2000; Brighina et al., 2005, 2010). Tale discrepanza potrebbe dipendere dalle differenti intensità di stimolazione usate in studi diversi per lo stimolo condizionante e/o lo stimolo test. In particolare nello studio di Siniatchkin et al. (2007) sia lo stimolo condizionante che quello test erano applicati ad una intensità soprasoglia, a differenza degli altri studi in cui lo stimolo condizionante

veniva applicato ad una intensità sottosoglia. Il paradigma usato da Siniatchkin potrebbe essere pertanto più sensibile nel mettere in evidenza cambiamenti di ICF in accordo con Sanger et al. (2001) che ha mostrato come la ICF cresce con il crescere dell'intensità di stimolazione.

Anche per quanto riguarda la SICI sono stati riportati in letteratura dati contrastanti, per cui alcuni autori hanno messo in evidenza una ridotta SICI negli emicranici (Brighina et al., 2005, 2010), mentre altri non hanno trovato alcuna differenza significativa (Werhahn et al., 2000; Afra et al., 1998b). Anche in questo caso tali differenze potrebbero dipendere dalle diverse intensità di stimolazione utilizzate. Infatti, rispetto a Brighina et al. (2005, 2010), Afra et al. (1998b) utilizzavano una più alta intensità per lo stimolo condizionante, che potrebbe attivare in misura maggiore i circuiti intracorticali GABAergici (Sanger et al., 2001). Al contrario, Werhahn et al. (2000) utilizzavano una intensità più alta per lo stimolo test, rendendo il test in tal modo più sensibile nell'identificazione di cambiamenti di ampiezza del MEP legati all'attivazione di circuiti intracorticali inibitori.

La TMS è stata largamente utilizzata nell'emicrania anche per testare l'eccitabilità della corteccia occipitale tramite la valutazione della cosiddetta "soglia dei fosfeni" (phosphenes threshold, PT), definita come l'intensità di stimolazione più bassa necessaria ad elicitarne fosfeni (Merabet et al., 2003). Ancora una volta, studi diversi hanno fornito dati conflittuali, con alcuni gruppi che hanno riportato ridotta PT nell'emicrania (Aurora et al., 1998; Mulleners et al., 2001; Aurora and Chronicle, 2002), altri aumentata PT (Bohotin et al., 2003) e altri ancora che non hanno messo in evidenza differenze significative tra soggetti normali ed emicranici valutati nel periodo interictale (Afra et al., 1998b; Chadaide et al., 2007). In una recente metanalisi è stato dimostrato come i pazienti affetti da emicrania episodica con o senza aura mostrano valori di PT più bassi solo se si utilizza un coil circolare per la

stimolazione; al contrario, con l'utilizzo di un coil a otto le differenze non risultano significative (Brigo et al., 2012). Alla luce di questo dato, anche la diversa forma del coil utilizzato per la stimolazione magnetica andrebbe annoverata tra le possibili fonti di eterogeneità metodologica tra studi diversi. Un coil circolare, di fatto, è in grado di stimolare un'area corticale di maggiori dimensioni potendo generare un campo elettrico di maggiore intensità in grado di determinare una maggiore attivazione corticale (Cohen et al., 1990).

La tecnica del doppio stimolo può essere utilizzata per incrementare gli effetti facilitatori indotti dalla TMS a livello della corteccia visiva quando si utilizza un coil a otto (Ray et al., 1998). A tal proposito, utilizzando un coil a otto per stimolare l'area visiva, Gerwig et al. (2005) osservavano come sebbene i valori di PT misurati con la TMS con singolo stimolo tendevano a essere più bassi nell'emicrania senza aura rispetto ai controlli, la differenza raggiungeva la significatività solo quando si utilizzava il doppio stimolo.

Considerati nel loro complesso, questi dati suggeriscono come per quanto riguarda sia la corteccia visiva che quella motoria di pazienti emicranici, è necessaria una certa entità di stimolazione al fine di mettere in evidenza una condizione di ipereccitabilità corticale.

Stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS)

Treni di diversi stimoli magnetici possono essere utilizzati per valutare in modo non invasivo, in vivo, fenomeni di plasticità sinaptica, grazie alla loro capacità di indurre cambiamenti di attività corticale che persistono per un certo tempo anche dopo la fine della stimolazione stessa (Hoogendam et al., 2010). Esistono diversi paradigmi di rTMS che differiscono tra loro soprattutto per il numero di stimoli, la frequenza, e l'intensità di stimolazione.

A livello della corteccia motoria, brevi treni di rTMS a intensità soprasoglia (\geq 120% della soglia motoria a riposo, RMT) e frequenza di 5 Hz, possono essere utilizzati per valutare risposte di tipo plasticità sinaptica di breve termine (short-term potentiation, STP), che rappresenta una forma di plasticità sinaptica mediata principalmente da meccanismi presinaptici di regolazione del rilascio di glutammato (Di Lazzaro et al., 2002; Inghilleri et al., 2005). Recentemente abbiamo osservato che in pazienti con emicrania con aura il potenziamento del MEP durante i treni di rTMS 5 Hz può essere indotto anche ad una intensità inferiore (110% della RMT) rispetto a quella minima necessaria per elicitare una risposta facilitatoria in soggetti di controllo (120% della RMT) (Brighina et al., 2011). Tale dato è in accordo con il concetto di iperresponsività di circuiti intracorticali eccitatori nell'emicrania, ed è anche in linea con i risultati di un lavoro di Conte et al. (2010) che mostra anche un incrementato potenziamento del MEP durante i treni rTMS a 5 Hz applicati al 120% della RMT in pazienti con emicrania con aura.

Sessioni di rTMS più prolungate posso permettere di valutare i due tipi principali di plasticità sinaptica di lungo termine, ovvero la "long-term depression" (LTD) e la "long-term potentiation" (LTP). Nei soggetti sani, la rTMS a bassa frequenza (compresa tra 0,2 e 1 Hz) determina una riduzione di eccitabilità corticale di tipo LTD, mentre la rTMS a più alte frequenze (\geq 5 Hz) induce risposte facilitatorie di tipo LTP (Hallett, 2007; Hoogendam et al., 2010). Il nostro gruppo di ricerca ha messo in evidenza risposte "paradosse" in pazienti emicranici sia alla rTMS a bassa frequenza che a quella ad alta frequenza. Per quanto riguarda la rTMS a bassa frequenza, abbiamo infatti osservato che il normale effetto inibitorio che si osserva dopo la fine di sessioni di rTMS a 1 Hz applicate sia sull'area visiva che su quella motoria, era sostituito nei pazienti emicranici da una risposta paradossa di tipo facilitatorio (Brighina et al., 2002; 2005). Questo risultato potrebbe essere spiegato

in due modi: 1) Potenziamento di circuiti intracorticali facilitatori; 2) deficit di circuiti intracorticali inibitori, che non verrebbero “down-regolati” dalla rTMS 1 Hz. Tra le due, la più verosimile sembra essere la prima interpretazione, alla luce dell’evidenza che sia la LTD che la LTP sono fenomeni NMDA-dipendenti mediatati dalla depolarizzazione della membrana postsinaptica a livello di sinapsi glutammatergiche, piuttosto che da cambiamenti di lunga durata dell’attività di circuiti GABAergici (Lisman e Spruston, 2005).

In particolare, si ipotizza che un ingresso di Ca^{2+} postsinaptico di entità moderata attraverso i canali NMDA può indurre LTD, mentre per l’induzione di LTP sono necessarie concentrazioni di Ca^{2+} postsinaptiche più elevate che raggiungono appunto un valore soglia per l’elicitazione di LTP (Lisman, 2001; Antic et al., 2010).

Alla luce di quanto detto, si potrebbe ipotizzare che nei soggetti sani la rTMS a 1 Hz potrebbe determinare solo un’attivazione moderata delle sinapsi glutammatergiche, in grado di indurre LTD. Al contrario, nei soggetti emicranici, una responsività aumentata dei circuiti intracorticali glutammatergici alla rTMS 1 Hz potrebbe permettere ai circuiti neuronali di raggiungere il valore soglia per elicitare LTP, spiegando in tal modo l’effetto paradossale facilitatorio. Ciò significa che la risposta “facilitatoria” osservata negli emicranici, opposta rispetto a quella “inibitoria” che si registra nei soggetti sani, potrebbe dipendere dal diverso grado di attivazione corticale indotto dallo stesso paradigma di rTMS. Il possibile significato delle risposte paradosse inibitorie osservate con la rTMS a 5 Hz è discusso nel paragrafo successivo.

Ipoeccitabilità corticale nell’emicrania: il ruolo della plasticità omeostatica corticale

La plasticità omeostatica, anche detta metaplasticità, si riferisce a tutti quei meccanismi che stabilizzano l'eccitabilità dei circuiti neuronali mantenendo la frequenza di scarica dei neuroni all'interno di un preciso, seppur dinamico, range fisiologico (Turrigiano e Nelson, 2004). I dati di recenti studi neurofisiologici (Antal et al., 2008; Brighina et al., 2011) e di neuroimaging (Sándor et al., 2005; Siniatchkin et al., 2012) condotti in pazienti emicranici sono stati interpretati ipotizzando una disregolazione della metaplasticità corticale. A tal proposito noi abbiamo osservato che, in pazienti con emicrania con aura, la risposta facilitatoria incrementata osservata durante i treni di rTMS 5 Hz a intensità di stimolazione del 110%, veniva sostituita da una risposta paradossa inibitoria aumentando l'intensità di stimolazione al 130% della RMT (Brighina et al., 2011). Per spiegare tale dato noi abbiamo ipotizzato che meccanismi omeostatici inibitori potrebbero venire attivati in risposta a stimolazioni di maggiore intensità per evitare, in una condizione di aumentata eccitabilità di base, l'induzione di una iperattivazione eccessiva e potenzialmente dannosa per gli stessi circuiti. Questa interpretazione è supportata da alcune evidenze sperimentali: 1) in soggetti sani, la risposta facilitatoria del MEP registrata durante treni di rTMS a 5 Hz, è sostituita da una risposta inibitoria se i treni sono preceduti da una sessione di stimolazione transcranica con correnti continui anodiche (tDCS anodica) che aumenta lo stato di eccitabilità corticale (Cosentino et al., 2012); 2) una riduzione di eccitabilità corticale motoria indotta sperimentalmente con tDCS catodica (che riduce l'eccitabilità corticale) in pazienti emicranici, normalizza la risposta facilitatoria a treni di rTMS applicati al 130% in pazienti con emicrania sia con che senza aura (Cosentino et al., 2013).

Dati apparentemente contrastanti di studi neurofisiologici come gli effetti paradossi inibitori osservati a livello della corteccia motoria emicranica dopo più lunghe

sessioni di rTMS a 10 Hz (Brighina et al., 2010), e la capacità della rTMS a 10 Hz di ristabilire l'abituazione durante potenziali evocati visivi (Bohotin et al., 2002; Fumal et al., 2006) e somatosensitivi (Coppola et al., 2012) nell'emicrania, potrebbero essere interpretati alla luce delle regole della plasticità omeostatica corticale. Infatti, in accordo con il modello di Bienenstock-Cooper-Munro (BCM model) (Bienenstock et al., 1982) in una condizione di aumentata eccitabilità corticale, come quella ipotizzata nell'emicrania, la soglia per l'induzione di LTP si alza, mentre si abbassa quella per l'induzione di LTD. Pertanto è possibile che la rTMS ad alta frequenza, che nei soggetti normali induce LTP, nei pazienti emicranici potrebbe invece attivare la corteccia fino al raggiungimento della soglia per l'induzione di LTD. Contestualmente, l'induzione di meccanismi regolatori inibitori in grado di contrastare l'iperresponsività corticale potrebbe permettere il ripristino dell'abituazione.

Il concetto che nell'emicrania, nel periodo intercritico, un'aumentata attivazione corticale potrebbe portare ad uno slittamento delle soglie per la plasticità sinaptica è in linea con due studi di risonanza magnetica spettroscopica che hanno studiato la corteccia visiva. Nel primo studio, Sándor et al. (2005) registravano livelli di lattato aumentati in pazienti con emicrania con aura a riposo, senza che questi aumentassero ulteriormente durante stimolazione visiva prolungata. Nel secondo studio, di Siniatchkin et al. (2012), veniva invece registrato, sempre a livello della corteccia occipitale, un più alto rapporto glutammato/creatina nei pazienti emicranici rispetto ai controlli. Gli autori mostravano anche che la tDCS anodica, eccitatoria, se nei soggetti sani era in grado di determinare un incremento dei valori del rapporto Glx/Cr, negli emicranici aveva un effetto paradossale inibitorio.

Le evidenze a favore di una ridotta soglia per risposte corticali di tipo omeostatico inibitorio in pazienti emicranici, supporta l'ipotesi che una condizione di

iperresponsività corticale gioca un ruolo centrale nella fisiopatologia dell'emicrania. Infatti l'ipotesi di una ridotta preattivazione corticale come "primum movens" della fisiopatologia emicranica non può spiegare, di per sé, il perché una stimolazione cerebrale ad alta intensità non è in grado di ripristinare un normale stato di eccitabilità corticale. Sono necessari ulteriori studi al fine di chiarire in che modo l'ipereccitabilità corticale emicranica è in grado di interferire con le soglie per la plasticità sinaptica e con il fenomeno dell'abituazione. A tal proposito è bene sottolineare il concetto che i meccanismi di regolazione presinaptica del rilascio di glutammato, la cui disfunzione è ipotizzata da alcuni autori alla base dell'iperresponsività emicranica (Pietrobon e Striessnig, 2003; Brighina et al., 2011; Cosentino et al., 2011; Siniatchkin et al., 2012), gioca un ruolo centrale sia nell'ambito della metaplasticità corticale (Moulder et al., 2006) che dell'abituazione a stimolo ripetitivi (Kandel e Schwartz, 1982). Sono inoltre necessari studi longitudinali per chiarire il possibile ruolo della metaplasticità nella ricorrenza degli attacchi emicranici e nella evoluzione del disturbo emicranico nel tempo (Antal et al., 2008; Chen et al., 2012). A tal proposito si veda la parte sperimentale di questa tesi in cui sono presentati i risultati di uno studio condotto con treni di rTMS a 5 Hz in pazienti con emicrania episodica valutati in diverse fasi del ciclo emicranico e in pazienti con emicrania cronica (Cosentino et al., 2014).

Conclusioni e ipotesi di modello fisiopatologico unitario per l'emicrania

I dati degli studi sopradiscussi rafforzano l'idea che i protocolli neurofisiologici comunemente utilizzati per testare la responsività e l'eccitabilità della corteccia emicranica possono indurre, in pazienti emicranici, risposte diverse e a volte paradosse rispetto a quelle osservate nei soggetti sani, in relazione ai differenti parametri di stimolazione utilizzati, da cui dipende il grado complessivo di

attivazione corticale (Fig. 1). Questa interpretazione può spiegare il perché di dati contrastanti nell'emicrania, ora di aumentata ora di ridotta eccitabilità corticale, e può permettere di elaborare un modello fisiopatologico unitario.

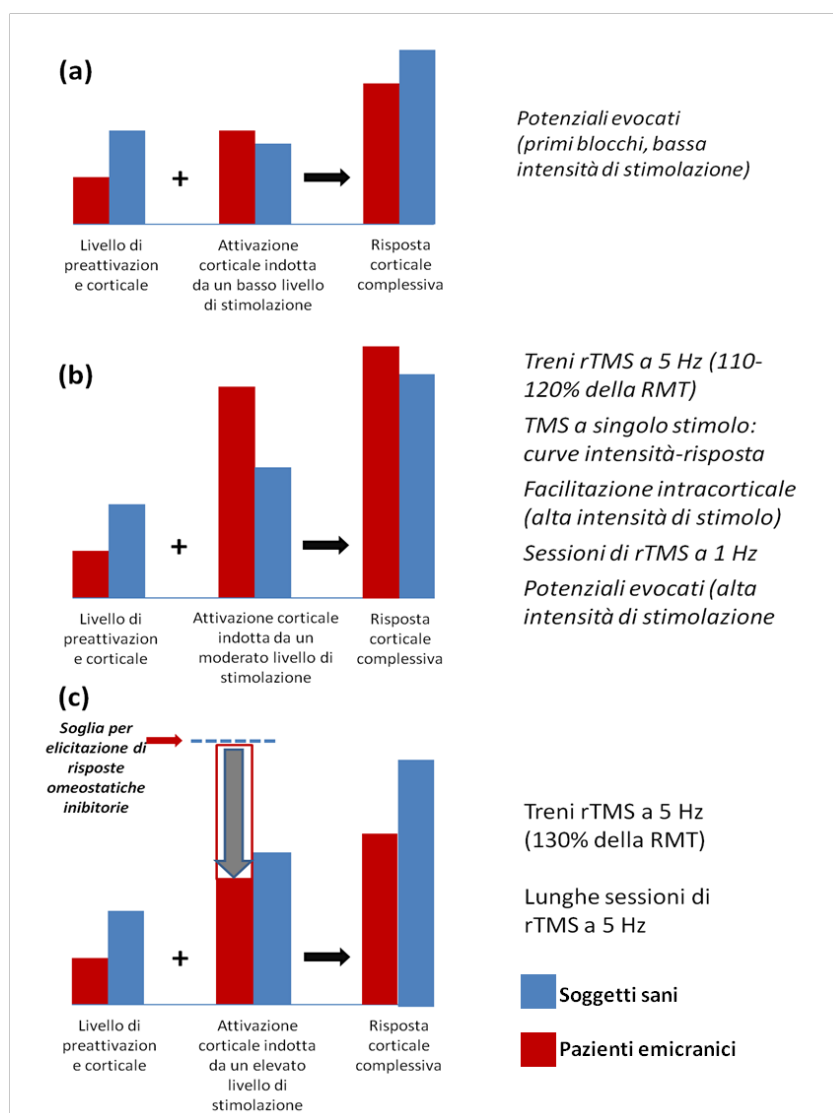


Fig. 1. La figura esemplifica il concetto che in pazienti emicranici, così come in soggetti sani, il livello complessivo di attivazione corticale indotto da un paradigma di stimolazione cerebrale non invasivo dipende dall'entità globale della stimolazione stessa oltreché dal livello di preattivazione corticale di base. L'altezza delle barre rappresenta diversi livelli di attivazione corticale. A fianco sono rappresentati alcuni dei principali protocolli neurofisiologici che hanno fornito dati conflittuali in pazienti emicranici valutati durante il periodo interictale. E'

importante sottolineare il concetto che lo stesso paradigma di stimolazione può mettere in evidenza, in relazione a diversi parametri di stimolazione utilizzati (es. frequenza, intensità e durata di stimolazione) aspetti diversi di un abnorme stato di eccitabilità corticale nell'emicrania. (a) Un basso livello di stimolazione, non sufficiente ad elicitare una significativa iperresponsività corticale, potrebbe dare prevalentemente informazioni sulla presenza di una ridotta preattivazione corticale nell'emicrania; (b) nell'emicrania, l'ipoattivazione corticale di base non è sufficiente a controbilanciare la più pronunciata iperresponsività corticale che si osserva in risposta ad un maggior livello di stimolazione cerebrale; (c) sempre nell'emicrania, il dato di ipoeccitabilità corticale in risposta a livelli di stimolazione ancora più elevati potrebbe dipendere ad un raggiungimento della soglia per l'elicitazione di risposte omeostatiche inibitorie.

Quello che potremmo ipotizzare è che una primitiva iperresponsività di circuiti intracorticali eccitatori potrebbe rappresentare il “primum movens” nella fisiopatologia dell'emicrania (Fig. 2). Quest'ipotesi è supportata, oltre che da i sopradescritti studi neurofisiologici e di neuroimaging, da altre evidenze sperimentali: 1) un'eccessiva attivazione di circuiti eccitatori glutammatergici è alla base dell'innescò e della propagazione delle onde di cortical spreading depression (Somjen, 2001; Peeters et al., 2007); 2) i livelli di glutammato nel plasma, nel liquido cerebrospinale, nelle piastrine e negli eritrociti di pazienti con emicrania con e senza aura sono aumentati rispetto a quelli dei soggetti sani, sia nel periodo interictale che durante gli attacchi (D'Andrea et al., 1991; D'Eufemia et al., 1997; Alam et al., 1998; Martínez et al., 2003); 3) farmaci antiepilettici che agiscono sul sistema glutammatergico hanno un ruolo nella terapia di profilassi dell'emicrania (Vikelis e Rapoport, 2010); 4) modelli animali di emicrania emiplegica familiare

(FHM) mostrano come un aumentato rilascio di glutammato dovuto ad eccessivo ingresso presinaptico di Ca^{2+} rappresenta la via finale comune di diverse alterazioni genetiche alla base del disturbo (Pietrobon e Striessnig, 2003; van den Maagdenberg et al., 2004). A proposito di quest'ultimo dato, è interessante il fatto che Hansen et al. (2011) hanno osservato come in pazienti con FHM non vi sia un deficit, quanto piuttosto un'aumentata abitudine ai potenziali evocati. Questo dato è stato interpretando ipotizzando l'esistenza di diversi meccanismi fisiopatologici alla base degli attacchi di emicrania in pazienti con FHM e in pazienti con più comuni forme di emicrania. Tuttavia, dal momento che attacchi di emicrania senza deficit motorio sono molto frequenti in pazienti con FHM, appare difficile ipotizzare l'esistenza di meccanismi fisiopatologici molto diversi. Inoltre, come visto sopra, non sempre l'ipereccitabilità corticale si associa ad un deficit di abitudine, in linea con il concetto che un eccessivo aumento di eccitabilità corticale potrebbe ridurre la soglia per l'elicitazione di risposte omeostatiche inibitorie permettendo in tal modo il ripristino di una normale, o addirittura aumentata abitudine a stimoli ripetitivi.

Bisogna osservare che l'ipotesi di una primitiva alterazione glutammatergica non è in contrasto con i dati a favore di una disfunzione dei circuiti intracorticali inibitori nell'emicrania, dal momento che questa può essere interpretata come incapacità dei neuroni intracorticali GABAergici ad inibire circuiti glutammatergici iperresponsivi. Tale interpretazione è supportata dall'evidenza sperimentale che le metodiche neurofisiologiche comunemente utilizzate per testare l'attività di circuiti intracorticali inibitori presentano sempre il rischio di misurare in realtà l'attività dei circuiti inibitori contaminata da quella dei circuiti facilitatori (Peurala et al., 2008).

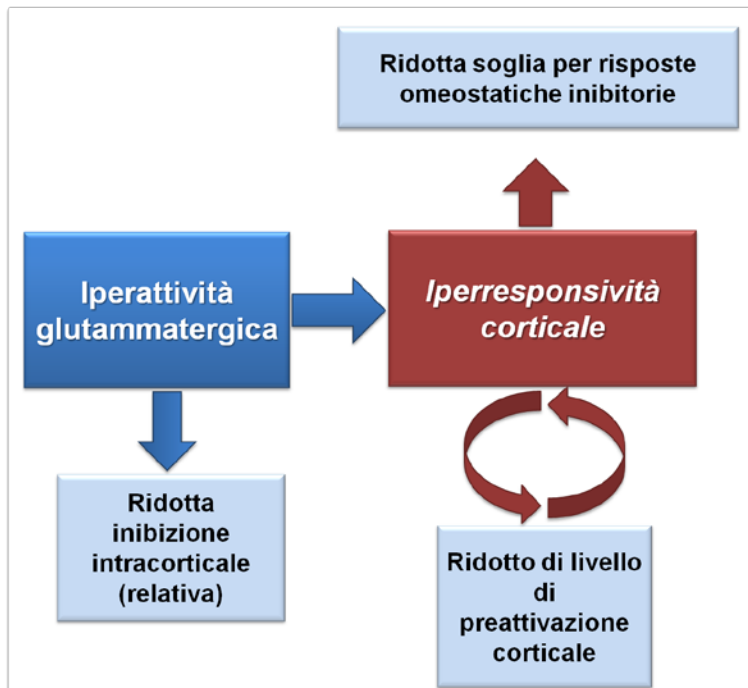


Fig. 2. *L'ipotesi di una primitiva iperattività glutamatergica nell'emicrania potrebbe spiegare i diversi aspetti della cosiddetta "diseccitabilità" emicranica. Conseguenze diverse potrebbero essere l'iperresponsività del sistema nervoso a diversi tipi di stimoli e la ridotta efficienza di circuiti inibitori GABAergici nell'inibire l'attività di circuiti glutamatergici iperresponsivi. Invece la "down-regulation" del talamo e dei nuclei del tronco encefalo, così come l'abbassamento della soglia per le risposte omeostatiche inibitorie, potrebbero rappresentare meccanismi di compenso. Infatti la prima potrebbe controbilanciare, almeno in parte, l'aumentata attivazione corticale indotta da diversi tipi di stimoli. I meccanismi omeostatici inibitori potrebbero invece prevenire un'eccessiva attivazione corticale in risposta a stimoli che potrebbero altrimenti destabilizzare l'attività dei circuiti neuronali.*

Per concludere possiamo ipotizzare che nell'emicrania, dati apparentemente conflittuali di studi diversi potrebbero semplicemente riflettere le sfaccettature

diverse di un più complesso quadro di “diseccitabilità” corticale. Bisogna inoltre considerare che solo una profonda conoscenza dei meccanismi fisiopatologici alla base dell’emicrania potrà permettere lo sviluppo di nuove e più mirate strategie terapeutiche sia di tipo farmacologico che non farmacologico, ad es. basate sull’applicazione terapeutica di metodiche di stimolazione cerebrale non invasiva.

Parte sperimentale

Introduzione

I meccanismi fisiopatologici alla base dell' attacco emicranico, così come i meccanismi responsabili della “cronicizzazione” della cefalea emicranica, che avviene in una piccola ma rilevante percentuale di pazienti, restano ad oggi poco conosciuti.

Secondo la maggior parte degli autori, una condizione di “iperresponsività” a stimoli esogeni ed endogeni rappresenta il fattore alla base dello scatenarsi di un attacco emicranico (Aurora et al., 1999b; Welch, 2003; Coppola et al., 2007; Pietrobon e Moskowitz, 2013). Ad ogni modo, i precisi meccanismi fisiopatologici che portano all'attacco restano dibattuti. Infatti mentre alcuni autori vedono nel tronco encefalo il “generatore” degli attacchi emicranici (Weiller et al., 1995; Cao et al., 2002; Afridi et al., 2005), i risultati di altri studi supportano l'idea secondo cui gli attacchi emicranici originano a livello della corteccia cerebrale (Welch, 2005; Bolay, 2012; Pietrobon e Moskowitz, 2013).

Il processo di cronicizzazione, o “trasformazione”, dell'emigrania rappresenta oggi un altro importante oggetto di dibattito nel campo della ricerca sulle cefalee. Esso si riferisce alla progressione nel tempo da forme di emigrania episodica (episodic migraine, EM) a forme di emigrania cronica (chronic migraine, CM), una condizione associata a importante disabilità e al rischio potenziale di danno cerebrale (Bigal et al., 2008; Schmitz et al., 2008; Blumenfeld et al., 2011). Anche se sono stati identificati diversi fattori di rischio per la cronicizzazione, come l'obesità e l'uso eccessivo di farmaci sintomatici, i meccanismi fisiopatologici che sottendono l'evoluzione della patologia nel tempo restano in larga misura sconosciuti (Bigal e Lipton, 2009). In questi ultimi decenni, la stimolazione magnetica transcranica (transcranial magnetic stimulation, TMS) si è affermata

come uno strumento prezioso e fondamentale per lo studio non invasivo dello stato di eccitabilità corticale “in vivo” in diverse patologie neurologiche (Rossini e Rossi, 2002) . Davvero pochi studi, ad ogni modo, sono stati effettuati in pazienti con EM valutati nelle diverse fasi del ciclo emicranico, e dati conflittuali sono stati riportati in pazienti con CM.

Obiettivi di questo studio sono stati pertanto quelli di: 1) valutare i cambiamenti di eccitabilità dell’area motoria primaria durante le diverse fasi del ciclo emicranico (periodo interictale, pre-ictale, ictale e post-ictale) in pazienti affetti da emicrania episodica con aura (migraine with aura, MwA) e senza aura (migraine without aura, MwoA); 2) confrontare l’eccitabilità corticale motoria di pazienti con emicrania episodica ed emicrania cronica, e soggetti sani di controllo; 3) valutare se diversi patterns di eccitabilità corticale sottendono fenotipi clinici differenti.

Il paradigma di TMS utilizzato nel presente studio consiste in brevi treni di TMS ripetitiva (rTMS) applicati sull’area motoria primaria della corteccia cerebrale ad una frequenza di 5 Hz e ad una intensità del 120% rispetto alla soglia motoria a riposo (resting motor threshold, RMT). Nei soggetti sani, tali treni di rTMS inducono un progressivo potenziamento del potenziale evocato motorio (motor evoked potential, MEP) elicitato da ogni stimolo del treno (Pascual-Leone et al., 1994), che si ipotizza sia mediato da meccanismi facilitatori presinaptici di rilascio del neurotrasmettitore eccitatorio glutammato (Di Lazzaro et al., 2002; Inghilleri et al., 2005). Il terminale presinaptico glutammatergico rappresenta anche una sede cruciale per la regolazione “omeostatica” dell’eccitabilità corticale, cioè della cosiddetta “plasticità omeostatica corticale” o “metaplasticità” (Moulder et al., 2006; Lee et al., 2010; Mochida, 2011). In accordo a tale dato, i treni di rTMS a 5 Hz applicati a intensità soprasoglia (120% della RMT) si sono rivelati in grado di indurre in soggetti sani, in condizioni sperimentali di aumentata eccitabilità

corticale, risposte motorie omeostatiche di tipo inibitorio (Cosentino et al., 2012).

Su queste basi, nel presente studio i treni di rTMS a 5 Hz sono stati applicati a intensità del 120% della RMT sulla corteccia motoria emicranica al fine di studiare, in diversi sottotipi emicranici, le relazioni tra alterata eccitabilità corticale e meccanismi di metaplasticità corticale.

La metaplasticità comprende tutti quei meccanismi che hanno l'obiettivo di stabilizzare l'eccitabilità corticale mantenendo l'attività dei diversi circuiti neuronali all'interno di una range fisiologico, in primis al fine di evitare che un'eccessiva frequenza di scarica di popolazioni neuronali possa risultare dannosa per il parenchima cerebrale (Bienenstock et al., 1982; Turrigiano e Nelson, 2004). Recentemente è stato ipotizzato che la metaplasticità potrebbe giocare un ruolo nella patogenesi dell'emicrania (Antal et al., 2004; Siniatchkin et al., 2012; Cosentino et al., 2013). Il nostro studio, pertanto, potrà fornire informazioni utili a chiarire il modo il cui modificazioni dell'eccitabilità corticale e meccanismi della plasticità omeostatica possono contribuire alla natura parossistica dell'emicrania e alla sua tendenza ad evolvere nel tempo da forme episodiche a bassa frequenza a forme episodiche con più alta frequenza di attacchi fino all'emicrania cronica.

Metodi

Soggetti

Sono stati arruolati nello studio 148 soggetti, tutti destrimani, così ripartiti: 66 pazienti affetti da emicrania senza aura episodica (51F/15M, età media $37,9 \pm 9,6$ anni), 48 pazienti con emicrania con aura episodica (34F/14M, età media $38,3 \pm 12,4$ anni), 14 pazienti con emicrania cronica (12F/2M, età media $38,3 \pm 14,5$ anni), e 20 soggetti sani di controllo (15F/5M, età media $33,8 \pm 7,5$ anni) senza storia di cefalee ricorrenti o familiarità di primo grado per emicrania. I pazienti sono stati

reclutati presso l'Ambulatorio delle Cefalee del dipartimento di Neurologia del Policlinico Universitario P. Giaccone di Palermo. La diagnosi di emicrania episodica e di emicrania cronica è stata posta, rispettivamente, sulla base dei criteri diagnostici della classificazione internazionale delle cefalee (2nd ed.; ICHD-2) e sulla base dei criteri revisionati (Headache Classification Committee, 2006).

Inoltre, prima di essere sottoposti a procedure sperimentali, tutti i pazienti arruolati venivano invitati a compilare per un periodo di minimo 3 mesi un diario delle cefalee, al fine di poter valutare le principali caratteristiche della cefalea (quali ad esempio frequenza degli attacchi, intensità e durata degli stessi, assunzione di farmaci sintomatici, presenza o meno di sintomi di aura). Tutti i pazienti affetti da emicrania con aura presentavano sintomi di aura visiva in almeno il 50% degli attacchi. La frequenza di attacchi in pazienti con emicrania episodica (con o senza aura) variava da 0.5 a 8 attacchi al mese (1-12 giorni di mal di testa al mese), mentre i pazienti con emicrania cronica presentavano, da almeno tre mesi, un minimo di 15 giorni di cefalea al mese (di cui 8 giorni al mese con cefalea a carattere emicranico). Tutti i pazienti con emicrania cronica riferivano una storia di emicrania senza aura episodica sulla base dei criteri della società internazionale delle cefalee (IHS). Nessuno dei pazienti aveva praticato, nei 3 mesi precedenti, una terapia di profilassi. I pazienti con emicrania cronica venivano esclusi se la loro cefalea si era presentata a seguito di un trauma cranico, se presentavano un disturbo psichiatrico, o in presenza di uso eccessivo di farmaci sintomatici. Tutti i pazienti negavano qualsiasi storia di patologie sistemiche o neurologiche e presentavano una obiettività neurologica e generale nella norma.

Sottogruppi diversi di pazienti affetti da emicrania episodica venivano valutati in diverse fasi del "ciclo" emicranico. I pazienti che non avevano presentato alcun attacco in un intervallo di tempo compreso tra 2 giorni prima e 2 giorni dopo la

valutazione sperimentale venivano classificati come “interictali”. I pazienti che presentano un attacco emicranico in corso al momento della valutazione sperimentale venivano classificati come “ictali”, infine i pazienti valutati nell’arco delle 48 ore precedenti l’inizio dell’attacco o seguenti la fine dello stesso venivano rispettivamente classificati come preictali e postictali. Sulla base di precedenti lavori (Chen et al., 2009), nei pazienti con emicrania cronica le valutazioni sperimentali venivano effettuate secondo gli stessi criteri considerati per il periodo interictale dei soggetti con emicrania episodica (ovvero nessuna attacco con carattere emicranico nelle 48 ore precedenti o seguenti la valutazione elettrofisiologica), tuttavia ammettendo che i pazienti potessero presentare una cefalea di “sottofondo” a carattere tensivo. In tutti i pazienti, il verificarsi di un attacco emicranico dopo la valutazione sperimentale veniva registrato per mezzo di una chiamata telefonica. I criteri temporali utilizzati per indicare un periodo come “peri-ictale” (preictale o postictale) sono stati scelti sulla base di precedenti evidenze (Evers et al., 1999; Judit et al., 2000).

Tutti i pazienti venivano sottoposti alla valutazione neurofisiologica solo se non avevano assunto farmaci sintomatici nell’arco delle 24 ore precedenti. Questo al fine di evitare possibili effetti aspecifici dell’attività di tali farmaci. Inoltre, per minimizzare l’influenza delle fluttuazioni ormonali legate al ciclo mestruale, le pazienti e i controlli di sesso femminile non venivano valutate durante la fase mestruale. Prima di essere reclutati nello studio, veniva esclusa in tutti i soggetti la presenza di controindicazioni alla valutazione tramite TMS (Keel et al., 2001). Inoltre tutti i soggetti firmavano un consenso informato alla partecipazione allo studio.

Lo studio è conforme ai criteri della dichiarazione di Helsinki e le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato etico locale. I dati clinici e demografici dei soggetti sono riportati nella Tabella 1.

		Soglia motoria a riposo (RMT)	Età (anni)	Sesso (F/M)	Frequenza di attacchi (attacchi/mese)	Durata di malattia (anni)	Severità della cefalea (1-3)	Durata degli attacchi (ore)
Emicrania con aura (n=48)	Interictale (n=27)	64,2 ± 7,5 (44-78)	38,8 ± 13,7 (18-64)	20/7	2,9 ± 2,1 (0,5-8)	19,1 ± 9,6 (5-43)	1,8 ± 0,7 (1-3)	27,1 ± 13 (6-72)
	Preictale (n=7)	67 ± 6,5 (60-80)	33,3 ± 5,3 (27-41)	5/2	3,9 ± 2 (2-8)	17,6 ± 2,5 (15-20)	2 ± 0,8 (1-3)	32 ± 13 (12-48)
	Ictale (n=7)	68 ± 9,7 (56-83)	40,3 ± 14,4 (18-67)	5/2	4,1 ± 2,8 (1-8)	18,6 ± 7,1 (15-30)	1,7 ± 0,8 (1-3)	34 ± 20,3 (12-72)
	Postictale (n=7)	64,3 ± 11,4 (43-78)	37,7 ± 10,4 (25-58)	5/2	3,6 ± 1,3 (2-6)	18,6 ± 7,5 (10-30)	1,7 ± 0,8 (1-3)	27,3 ± 17,8 (12-48)
Emicrania senza aura (n=66)	Interictale (n=36)	65,6 ± 9,2 (48-82)	39,2 ± 9,5 (20-53)	29/7	4,1 ± 2,3 (0,5-8)	19,2 ± 9,2 (2-35)	1,9 ± 0,7 (1-3)	32,1 ± 18,3 (6-72)
	Preictale (n=10)	65,2 ± 12,3 (42-82)	33,1 ± 8,6 (25-49)	8/2	4,4 ± 2,3 (0,5-8)	15,5 ± 6,8 (10-30)	1,9 ± 0,6 (1-3)	31,2 ± 18,1 (12-72)
	Ictale (n=10)	63,4 ± 9,47 (45-75)	39,4 ± 10,9 (23-54)	8/2	4,6 ± 2,2 (1-8)	20,7 ± 9,3 (8-34)	1,9 ± 0,9 (1-3)	27,2 ± 23,8 (12-72)
	Postictale (n=10)	61,7 ± 10,4 (42-80)	36,1 ± 10,3 (24-50)	8/2	3,6 ± 2,1 (0,5-8)	15,4 ± 6,9 (6-25)	2,1 ± 0,7 (1-3)	25,5 ± 17,3 (12-48)
Emicrania cronica (n=14)		69 ± 5,7 (58-80)	38,3 ± 14,6 (21-63)	12/2	13,9 ± 3,1 (10-18)	21,7 ± 10,4 (10-45)	1,5 ± 0,6 (1-3)	25,6 ± 14,4 (6-48)
Soggetti sani (n=20)		60 ± 5,9 (48-70)	33,8 ± 7,5 (25-50)	15/5	-	-	-	-

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti arruolati: media ± DS e range di intervallo.

Procedure sperimentali

Tutti i soggetti venivano fatti sedere su di una sedia e veniva chiesto loro di mantenere uno stato di completo rilassamento muscolare. Veniva quindi posta sul capo una cuffia di plastica (tipo da piscina) sulla quale segnare il punto di stimolazione ottimale, in modo da assicurare un posizionamento ottimale del coil. I segnali elettromiografici (EMG) sono stati registrati dal muscolo abduktore breve del pollice (ABP) di destra utilizzando elettrodi di superficie a coppetta del

diametro di 0,9 cm, posizionati sul ventre muscolare e sul tendine del muscolo. Il segnale EMG è stato registrato con una banda passante di 10-1000 Hz e utilizzando nel display un “gain” compreso tra 50 e 1000 $\mu\text{V}/\text{cm}$. I segnali EMG sono stati analizzati off-line.

La TMS focale è stata applicata sull’area motoria primaria della mano attraverso un coil a farfalla connesso ad uno stimolatore magnetico monofasico “Cadwell High Speed Magnetic Stimulator” (Cadwell Laboratories, Kennewick, Wash., USA).

Il coil è stato posizionato con direzione postero-anteriore sull’hot-spot per il muscolo ABP controlaterale (André-Obadia et al., 2008). La soglia motoria a riposo (resting motor threshold, RMT) è stata definita come l’intensità di stimolazione minima in grado di elicitare nel muscolo ABP in stato di rilassamento potenziali motori di ampiezza minima di 50 μV in almeno il 50% di 10 trials. Al fine di mantenere uno stato di completo rilassamento muscolare, veniva fornito ai soggetti un feedback EMG audiovisivo. La posizione del coil è stata monitorata per tutta la durata degli esperimenti al fine di mantenerla costante. La stimolazione è stata effettuata seguendo le linee guida di sicurezza (Rossi et al., 2009).

Paradigma sperimentale e misurazioni

Tutti i soggetti sono stati valutati in un’unica sessione sperimentale in cui sono stati applicati sei treni di 10 stimoli magnetici a frequenza di 5 Hz sull’area motoria primaria di sinistra. I treni di rTMS sono stati applicati con un intervallo inter-treno di 2 minuti in soggetti a riposo, ad una intensità di stimolazione pari al 120% della RMT. Al fine di valutare variazioni di ampiezza del MEP durante i treni di rTMS, per ogni soggetto le ampiezze dei MEP venivano calcolate picco-picco a partire da singole tracce e quindi venivano calcolati i valori di ampiezza media secondo la posizione nel treno (cioè media di tutte le prime risposte, media di tutte le secondo

risposte, etc). Inoltre, dal momento che i treni di rTMS possono elicitare risposte motorie diverse, anche opposte (facilitatorie o inibitorie) (Brighina et al., 2011; Cosentino et al., 2011, 2014), sono state fatte delle analisi individuali al fine di classificare in ogni soggetto il pattern di risposta come “facilitatorio”, “inibitorio” o “piatto”. Abbiamo classificato come “facilitatorie” le risposte in cui almeno 6 delle risposte motorie successive alla prima presentavano ampiezza maggiore rispetto al primo MEP, con un rapporto di ampiezza tra il MEP più ampio nel treno e il primo MEP ≥ 1.3 . Al contrario, le risposte sono state classificate come “inibitorie” se almeno 6 dei MEP successivi al primo avevano una minore ampiezza, con un rapporto di ampiezza tra il MEP più basso e il primo ≤ 0.7 . Le risposte che non rientravano in nessuno dei due pattern precedenti venivano classificate come “piatte”. Questi criteri sono stati scelti sulla base di nostre precedenti osservazioni, secondo le quali sebbene nella maggior parte dei soggetti tutti i MEP elicitati da un treno di rTMS sono più ampi o più bassi in ampiezza rispetto al primo, può anche accadere che: 1) in alcuni casi, una chiara facilitazione del MEP si osserva solo a partire dalla terza o quarta risposta nel treno; 2) in soggetti che presentano una chiara risposta inibitoria del MEP, le ampiezze possono tornare a crescere lievemente dopo il decremento iniziale così che almeno due o tre risposte motorie nel treno possono raggiungere una ampiezza simile a quella del primo MEP (Brighina et al., 2011; Cosentino et al., 2012, 2014).

Analisi statistica

Al fine di confrontare i cambiamenti nell’ampiezza del MEP durante i treni rTMS registrati nei due gruppi di pazienti con emicrania episodica (emicrania con e senza aura) valutati nel periodo interictale, nei pazienti con emicrania cronica e nei soggetti sani, sono state effettuate analisi della varianza per misure ripetute

(ANOVA) a due vie, con fattore tra-soggetti “gruppo” e fattore intra-soggetti “numero di stimoli” (10 livelli).

Nei pazienti con emicrania episodica, per valutare possibili cambiamenti della risposta motoria corticale durante il ciclo emicranico, sono state effettuate analisi ANOVA a tre vie con fattori tra-soggetti “gruppo” (2 livelli: emicrania con aura e emicrania senza aura) e “fase del ciclo” (4 livelli: periodo interictale, preictale, ictale e postictale), e fattore intra-soggetti “numeri di stimoli” (10 livelli).

Dopo le analisi individuali (vedi sopra), se all’interno di un gruppo venivano identificati diversi sottogruppi di pazienti con differenti pattern di risposta (es. facilitatoria, piatta o inibitoria), veniva effettuata una analisi ANOVA a due vie con fattore tra-soggetti “sottogruppo” e fattore intra-soggetti “numero di stimoli (10 livelli). Inoltre, valutavamo possibili differenze tra i diversi sottogruppi inerenti parametri clinici e demografici attraverso il t-test di Student. Per comparare l’età media, l’ampiezza del primo MEP e la RMT tra i diversi gruppi di pazienti affetti da emicrania episodica con e senza aura valutati nelle diverse fasi del ciclo emicranico, i pazienti con emicrania cronica e i soggetti sani, venivano effettuate analisi ANOVA ad una via. Analisi ANOVA a una via sono state inoltre effettuate per comparare i parametri clinici (frequenza di attacchi, durata di malattia, durata e severità degli attacchi di cefalea) tra i differenti gruppi di pazienti emicranici che venivano valutati in differenti fasi del ciclo emicranico. L’assunzione di sfericità è stata verificata mediante il test di Mauchly, e la correzione di Huynh-Feldt è stata adottata, se necessario, per i gradi di libertà. Il test di Duncan è stato utilizzato per le analisi post-hoc. Per tutte le analisi il livello di significatività statistica utilizzato è stato di $p < 0.05$.

Risultati

Le procedure sperimentali sono state ben tollerate in tutti i soggetti e non sono stati riportati effetti collaterali. Non sono state evidenziate differenze significative per quanto riguarda l'età, l'ampiezza del primo MEP durante i treni di rTMS e la RMT tra pazienti con EM con e senza aura valutati nel periodo interictale, pazienti con CM e soggetti sani. Inoltre non sono state evidenziate differenze significative per quanto riguarda l'ampiezza del primo MEP e la RMT, così come per quanto concerne l'età e i parametri clinici, tra pazienti con emicrania con e senza aura valutati in diverse fasi del ciclo emicranico (Tabella 1).

L'ANOVA effettuata per valutare le differenze di ampiezza del MEP durante i treni rTMS in pazienti con EM con e senza aura, con CM e in soggetti sani di controllo (Fig. 1) ha mostrato una significatività del fattore "numero di stimoli" ($F_{(3, 313)} = 8,08; p = 0.00001$) e una significativa interazione tra i fattori "gruppo" e "numero di stimoli" ($F_{(10, 313)} = 2,29; p = 0.01$). L'analisi post-hoc ha mostrato che le ampiezze del MEP aumentavano significativamente durante i treni rTMS nei soggetti sani e si riducevano invece nei pazienti con emicrania cronica. Nei pazienti con emicrania episodica sia con che senza aura, invece, non si osservavano variazioni significative di ampiezza del MEP.

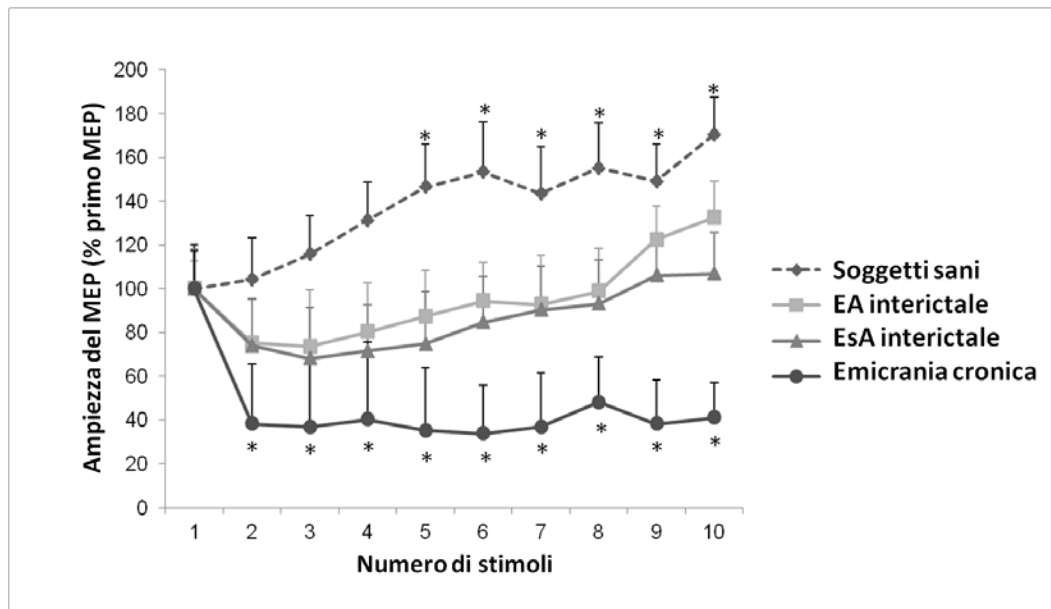


Figura 1. Potenziali evocati motori (MEP) elicitati da treni di rTMS applicati ad intensità del 120% della soglia motoria a riposo (RMT) in pazienti affetti da emicrania episodica (con aura: EA, senza aura: EsA) valutati nel periodo interictale, in pazienti con emicrania cronica e in soggetti sani. Le ampiezze medie del MEP sono espresse in percentuale rispetto all'ampiezza del primo MEP del treno. Le barre di errore indicano l'errore standard. Gli asterischi (*) indicano le variazioni significative di ampiezza del MEP durante i treni rTMS rispetto al primo MEP.

L'ANOVA effettuata per comparare le risposte durante i treni rTMS in pazienti con emicrania episodica (con e senza aura) valutati nelle diverse fasi del ciclo emicranico (Fig.2 A, B) ha mostrato una significatività dei fattori "numero di stimoli" ($F_{(9, 954)}=5,7268$, $p=0.00001$) e "fase del ciclo" ($F_{(3, 106)}=6,2573$, $p=0.0006$), ed una interazione significativa tra i fattori "numero di stimoli" e "fase del ciclo" ($F_{(27, 954)}=5,9799$, $p=0.00001$). Non è stata osservata significatività del fattore "gruppo" né interazione significativa tra "numero di stimoli", "fase del ciclo" e "gruppo". L'analisi post-hoc ha mostrato risposte facilitatorie con

progressivo incremento delle ampiezze del MEP durante i treni in pazienti con emicrania episodica con e senza aura valutati nel periodo preictale, mentre risposte inibitorie sono state osservate durante il periodo ictale e postictale. Non sono state osservate variazioni significative di ampiezza del MEP nel corso dei treni in pazienti con emicrania episodica con e senza aura valutati nel periodo intercritico.

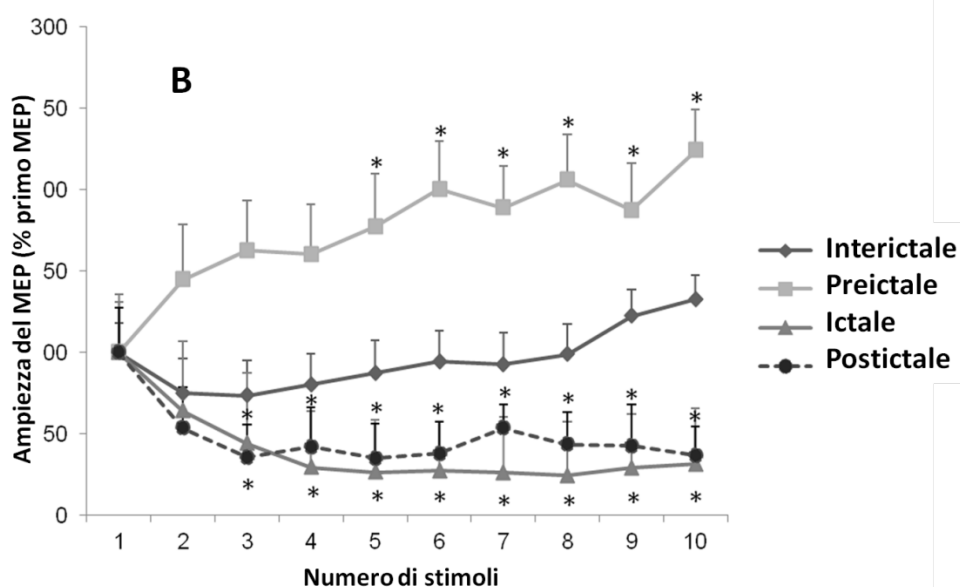
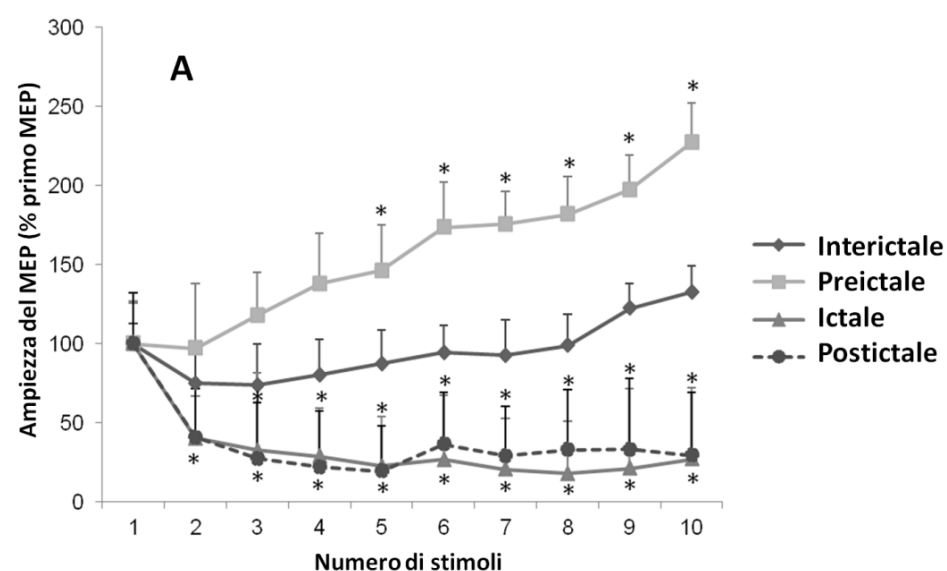


Figura 2. Potenziali evocati motori (MEP) elicitati da treni di rTMS applicati ad intensità del 120% della soglia motoria a riposo (RMT) in pazienti affetti da

emicrania episodica con aura (A) e senza aura (B) valutati in differenti fasi del ciclo emicranico: periodo interictale, preictale, ictale e postictale. Le ampiezze medie del MEP sono espresse in percentuale rispetto all'ampiezza del primo MEP del treno. Le barre di errore indicano l'errore standard. Gli asterischi () indicano le variazioni significative di ampiezza del MEP durante i treni rTMS rispetto al primo MEP.*

L'analisi individuale delle risposte motorie durante i treni (Tabella 2) ha mostrato che tutti i pazienti valutati nel periodo preictale e i soggetti sani presentavano risposte facilitatorie o piatte. Al contrario, tutti i pazienti valutati nel periodo ictale e postictale, così come i pazienti con emicrania cronica, presentavano risposte inibitorie. In pazienti con emicrania episodica valutati nel periodo interictale, sia con che senza aura, venivano osservati due diversi pattern di risposta: un sottogruppo di pazienti presentava risposte facilitatorie o piatte durante i treni (pattern osservato anche nei soggetti sani), mentre un altro presentava risposte inibitorie.

	Pattern di risposta motoria			
	Facilitatoria	Piatta	Inibitoria	
Emicrania con aura (n=48)	Interictale (n=27)	12	1	14
	Preictale (n=7)	5	2	-
	Ictale (n=7)	-	-	7
	Postictale (n=7)	-	-	7
Emicrania senza aura (n=66)	Interictale (n=36)	9	5	22
	Preictale (n=10)	7	3	-
	Ictale (n=10)	-	-	10
	Postictale (n=10)	-	-	10
Emicrania cronica (n=14)	-	-	14	
Soggetti sani (n=20)	15	5	-	

Tabella 2. Numero di soggetti presentanti differenti pattern di risposta motoria durante treni di rTMS in pazienti con emicrania episodica con e senza aura valutati in fasi diverse del ciclo emicranico, in pazienti con emicrania cronica e in soggetti sani di controllo.

Questi due sottogruppi di pazienti venivano comparati tra di loro e con i soggetti sani mediante un'analisi ANOVA a due vie (Fig. 3), che mostrava un significativo effetto del fattore "numero di stimoli" ($F_{(4, 286)} = 17,36, p = 0.00001$) e una interazione significativa tra i fattori "gruppo" e "numero di stimoli" ($F_{(15, 286)} = 6,18, p = 0,00001$). L'analisi post-hoc mostrava che le ampiezze del MEP aumentavano significativamente durante i treni nei soggetti sani e, inoltre, in misura maggiore, nei pazienti con emicrania episodica con e senza aura che presentavano un pattern di risposte facilitatorie/piatte durante i treni. Al contrario, un significativo decremento di ampiezza dei MEP durante i treni veniva osservato in pazienti con emicrania episodica sia con che senza aura che mostravano un pattern di risposte di tipo inibitorio durante i treni.

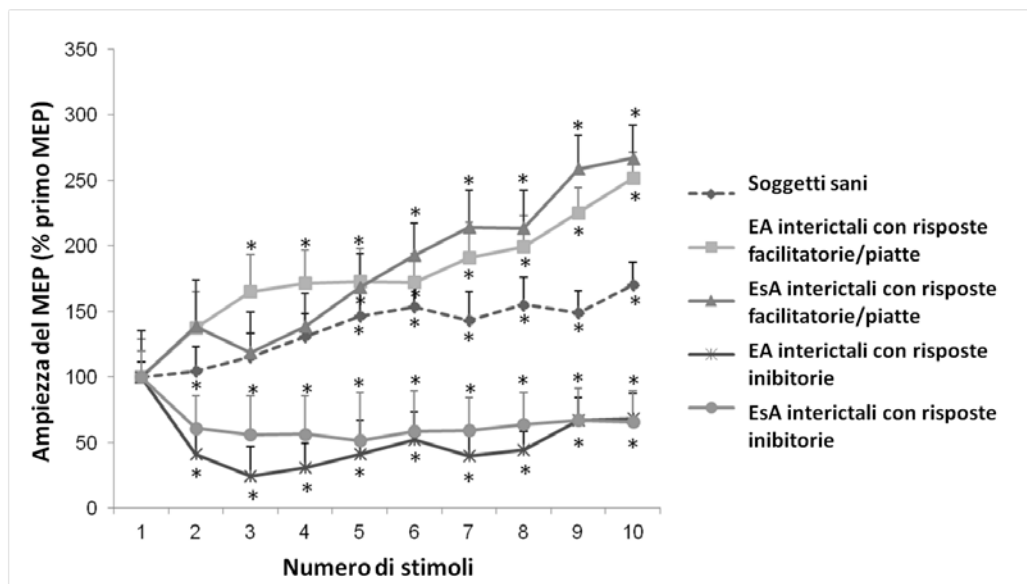


Figura 3. *Potenziali evocati motori (MEP) elicitati da treni di rTMS applicati ad intensità del 120% della soglia motoria a riposo (RMT) in differenti sottogruppi di pazienti affetti da emicrania episodica con e senza aura che presentano differenti pattern di risposta motoria nel periodo interictale: risposta facilitatoria/piatta ovvero risposta inibitoria. Le ampiezze medie del MEP sono espresse in percentuale rispetto all'ampiezza del primo MEP del treno. Le barre di errore indicano l'errore standard. Gli asterischi (*) indicano le variazioni significative di ampiezza del MEP durante i treni rTMS rispetto al primo MEP.*

Il test t di Student utilizzato per comparare sottogruppi di pazienti con emicrania episodica con e senza aura che presentavano un diverso pattern di risposta (Fig. 4) mostrava una significativa differenza per la frequenza media di attacchi, che risultava più alta in pazienti con risposte inibitorie del MEP rispetto a quella di pazienti con pattern di risposta di tipo facilitatoria/piatta ($4,2 \pm 1,7$ DS vs $1,2 \pm 0,9$ DS attacchi per mese in pazienti con emicrania con aura, $p < 0.00001$; $4,7 \pm 2,1$ DS vs $1,7 \pm 0,9$ DS attacchi per mese in pazienti con emicrania senza aura, $p < 0.00001$). Non venivano osservate altre differenze per quanto riguarda i diversi parametri clinici tra i sottogruppi (Fig. 4).

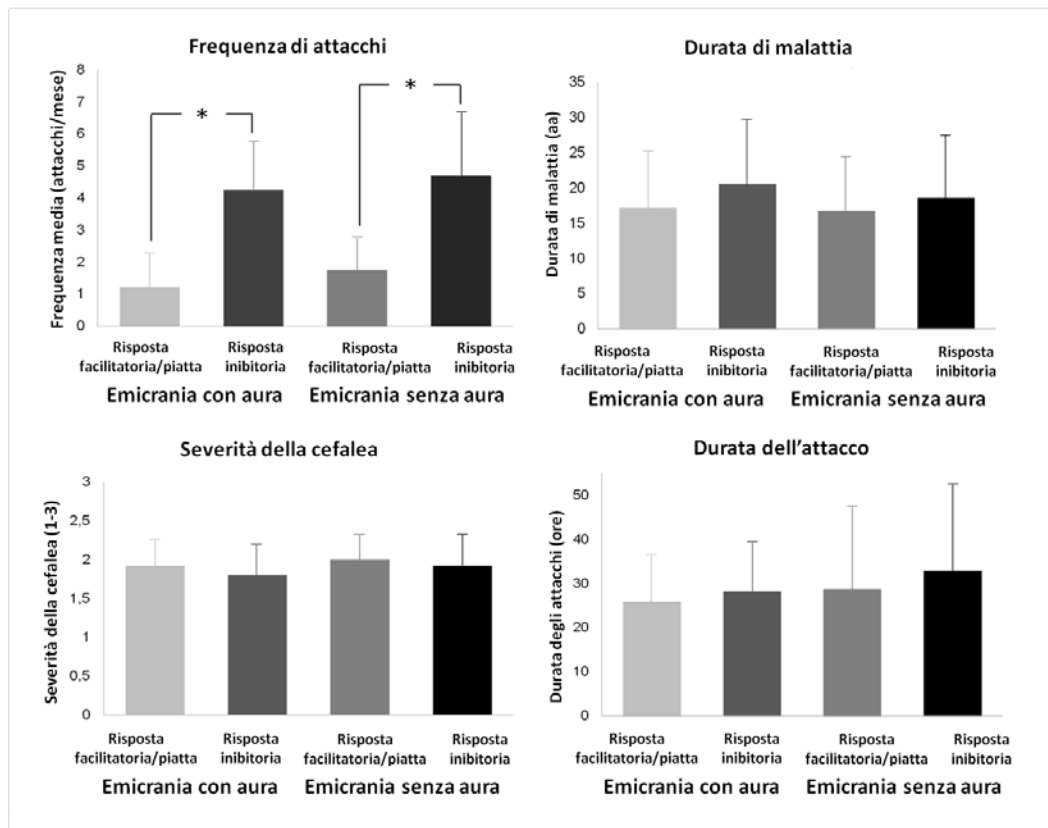


Figura 4. Confronto delle caratteristiche cliniche di pazienti con emicrania episodica con aura e senza aura valutati nel periodo interictale presentanti pattern opposti di risposta ai treni rTMS. * $p < 0.00001$.

La severità degli attacchi è stata valutata con un punteggio compreso tra 1 e 3 (1 = non interferenza nei confronti delle attività di vita quotidiana; 2 = interferenza parziale con le attività di vita quotidiana; 3 = impossibilità a svolgere le attività di vita quotidiana).

Il test di Pearson è stato utilizzato per correlare la frequenza media di attacchi con l'entità delle variazioni di ampiezza del MEP durante i treni rTMS, a sua volta misurata come rapporto tra l'ampiezza del MEP più grande o più piccolo nel treno (rispettivamente per i pattern di risposta facilitatorio/piatto e inibitorio) e l'ampiezza del primo MEP (Fig. 5). Tale analisi mostrava una significativa

correlazione in entrambi i sottogruppi di pazienti con emicrania con EM con aura ($r = -0.5, p < 0.01$) e senza aura ($r = -0.41, p < 0.05$).

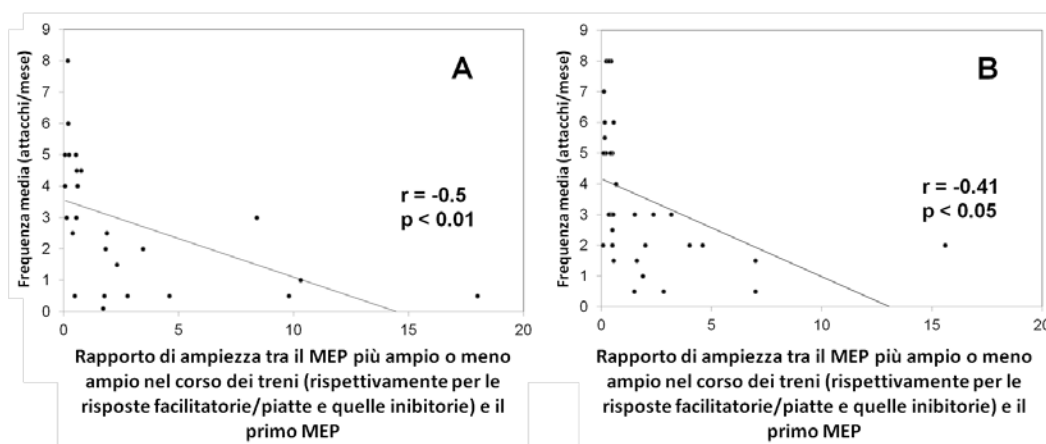


Figura 5. Correlazione tra l'entità dei cambiamenti di ampiezza del MEP durante i treni rTMS e la frequenza media di attacchi (attacchi/mese) in pazienti con emicrania con (A) e senza aura (B) valutati nell'intervallo tra gli attacchi.

Discussione

Risposte motorie corticali in pazienti con emicrania episodica in fase interictale.

Nel presente studio, brevi treni di rTMS a 5-Hz, quando applicati sulla corteccia motoria primaria, non elicitarono un normale potenziamento del MEP in pazienti con emicrania episodica con e senza aura valutati nel periodo interictale (Fig.1). Il rapido potenziamento di breve durata del MEP osservato durante treni di rTMS a intensità soprasoglia nei soggetti sani si pensa sia mediato da meccanismi facilitatori di plasticità sinaptica di breve termine che operano a livello corticale (Pascual-Leone et al., 1994; Berardelli et al., 1998; Inghilleri et al., 2005, 2006), e che sono principalmente dipendenti da meccanismi calcio-dipendenti di regolazione del rilascio del glutammato (Zucker et al., 2002; Isope et al., 2013). Pertanto i

risultati di questo lavoro sono in linea con altri dati di studi neurofisiologici (Siniatchkin et al., 2007; Conte et al., 2010; Cosentino et al., 2011), di neuroimaging (Siniatchkin et al., 2012) e biologici (D'Andrea et al., 1991; Martínez et al., 1993; D'Eufemia et al., 1997; Alam et al., 2005) che suggeriscono l'esistenza di una disfunzione glutammatergica nell'emicrania.

All'analisi individuale delle risposte osservavamo pattern di risposta diversi in pazienti valutati nel periodo interictale e confrontati con soggetti sani di controllo (Fig.3). In particolare, una facilitazione del MEP aumentata veniva osservata in pazienti con più bassa frequenza di attacchi, mentre una risposta del MEP paradossa, di tipo inibitorio, veniva osservata nei pazienti con più alta frequenza di attacchi (Fig.4). Questi risultati solo sono apparentemente in contrasto con quelli di Conte et al. (2010), che mostrava differenti pattern di risposta durante treni di rTMS a 5 Hz in pazienti con emicrania episodica con e senza aura. Infatti, in linea con i dati di questo lavoro, gli autori osservavano una facilitazione incrementata del MEP in un gruppo di pazienti con emicrania con aura che presentava una bassa frequenza media di attacchi. Invece, una mancata facilitazione del MEP veniva registrata nei pazienti con emicrania senza aura che presentavano una più alta frequenza di attacchi.

L'aumentato potenziamento del MEP osservato in pazienti con bassa frequenza di attacchi è in linea con altri studi di TMS che hanno mostrato una aumentata responsività della corteccia motoria (Siniatchkin et al., 2007; Conte et al., 2010; Cosentino et al., 2011), e una ridotta soglia per l'elicitazione di risposte facilitatorie (ovvero potenziamento del MEP a intensità del 110% della RMT) durante treni di rTMS a 5-Hz in pazienti emicranici (Brighina et al., 2011). Al contrario, il pattern di risposta di tipo inibitorio osservato nei pazienti con una più alta frequenza di attacchi, potrebbe essere interpretato nel contesto della plasticità omeostatica

corticale. Questa spiegazione è in accordo con il dato che in pazienti con emicrania episodica, parallelamente all'aumento della frequenza di attacchi, la facilitazione del MEP si riduce progressivamente fino ad essere sostituita da risposte inibitorie via via più pronunciate (Fig.5). Infatti, in accordo alle regole della metaplasticità corticale, l'aumento di eccitabilità corticale che si verificherebbe con l'aumento della frequenza di attacchi (van der Kamp et al., 1996; Aurora et al., 1999b), abbasserebbe la soglia per l'elicitazione di risposte omeostatiche di tipo inibitorio. Questa interpretazione ben si accorda con dati sperimentali in soggetti normali (Cosentino et al., 2012), così come con: 1) l'evidenza di ridotta soglia per la metaplasticità inibitoria (cioè risposte inibitorie del MEP a intensità del 130% della RMT) durante i treni rTMS a 5 Hz in pazienti emicranici (Brighina et al., 2011); 2) il dato che il preconditionamento con stimolazione elettrica con correnti continue (tDCS) catodica, che riduce il livello di eccitabilità corticale, ripristina una normale risposta facilitatoria del MEP durante i treni rTMS nei pazienti con EM con e senza aura (Cosentino et al., 2014).

Meccanismi omeostatici inibitori di eccitabilità corticale prevengono risposte eccitatorie eccessive e potenzialmente dannose della corteccia in risposta a stimoli di notevole entità (Hardingham et al., 2003). Pertanto, in pazienti emicranici con alta frequenza di attacchi, l'abbassamento della soglia per risposte omeostatiche inibitorie potrebbe rappresentare un meccanismo protettivo in grado di evitare un'attivazione corticale eccessiva ed incontrollata in risposta a stimoli esogeni o endogeni. Inoltre, si potrebbe ipotizzare che la metaplasticità inibitoria potrebbe rappresentare un tentativo di prevenire lo scatenarsi di ulteriori attacchi mediante la riduzione della responsività corticale ai triggers dell'attacco emicranico (Fig. 6A). Questa interpretazione è suggerita dall'evidenza che la soglia per risposte plastiche omeostatiche inibitorie, che non è costante ma fluttua fisiologicamente in relazione

ai cambiamenti di attività corticale (Bienenstock et al., 1982; Turrigiano e Nelson, 2004) aumenta subito prima l'origine dell'attacco (vedi sotto).

Eccitabilità corticale motoria durante il ciclo emicranico in pazienti con emicrania episodica

Nel presente studio sono state osservate notevoli fluttuazioni nella risposta motoria durante i treni di rTMS in pazienti emicranici valutati in diverse fasi del ciclo emicranico (Fig.2). E' importante sottolineare come questi diversi gruppi di pazienti non differivano tra loro per nessuno dei parametri demografici e clinici valutati (Tabella 1). Pertanto i cambiamenti nella risposta motoria sono verosimilmente legati ai meccanismi fisiopatologici responsabili della ricorrenza degli attacchi.

A nostra conoscenza, soltanto un altro studio di TMS ha valutato sistematicamente, in bambini affetti da emicrania senza aura, le variazioni di eccitabilità corticale durante il ciclo emicranico (Siniatchkin et al., 2009). Gli autori utilizzavano paradigmi di TMS diversi dai nostri mostrando uno shift nei livelli di eccitabilità della corteccia visiva, ma non osservavano, come nel presente lavoro, modificazioni della RMT.

Nelle 48 ore precedenti l'attacco noi osservavamo, sia in pazienti emicranici con che senza aura, un pattern di risposta facilitatorio simile a quello registrato nei soggetti sani. Questo potrebbe indicare che la soglia per risposte inibitorie di plasticità omeostatica aumenta nel periodo preictale. Tale interpretazione è in linea con l'evidenza, fornita da studi neurofisiologici e neuropsicologici, che l'iperresponsività che caratterizza i pazienti emicranici durante la fase intercritica tende a normalizzarsi, o anche a ridursi fino ad uno stato di ipoattività, subito prima di un attacco (Göder et al., 2001; Bruni et al., 2004; Peres et al., 2004; Siniatchkin

et al., 2009). Infatti, in linea con le regole della metaplasticità corticale, la soglia per le risposte omeostatiche inibitorie aumenta quando il livello di attività corticale si riduce. Si potrebbe ipotizzare che l'incremento della soglia per l'attivazione di meccanismi inibitori metaplastici potrebbe contribuire alla suscettibilità a sviluppare un attacco emicranico. Infatti questo potrebbe permettere a differenti fattori in grado di precipitare un attacco di indurre una incontrollata iperattivazione corticale culminante nella crisi emicranica (Fig.6B).

Nei pazienti emicranici con e senza aura che veniva valutati durante un attacco spontaneo osservavamo un decremento dell'ampiezza del MEP durante i treni. Questo dato non è in disaccordo con l'evidenza neurofisiologica che il livello di preattivazione corticale aumenta durante il periodo ictale (Judith et al., 2000), né con il riscontro di aumentati livelli di glutammato nel plasma e nel liquido cefalorachidiano in pazienti esaminati durante l'attacco di emicrania (Martínez et al., 1993; Alam et al., 1998). Infatti il brusco incremento di attivazione corticale che porta all'attacco emicranico dovrebbe contestualmente indurre un abbassamento della soglia per risposte corticali inibitorie di tipo omeostatico, in linea al riscontro sperimentale che in soggetti sani risposte inibitorie durante i treni rTMS possono essere registrate in condizioni sperimentali di aumentata eccitabilità corticale (Cosentino et al., 2012).

Sono necessari ulteriori studi per chiarire se la metaplasticità inibitoria rappresenta semplicemente un meccanismo protettivo durante l'attacco, in grado di prevenire l'eccitotossicità, oppure se può essere direttamente implicata nella fisiopatologia dell'emicrania. Di fatto è ipotizzabile che meccanismi omeostatici inibitori, essendo in grado di ridurre la responsività cerebrale a differenti triggers dell'attacco emicranico, potrebbe essere implicata nello spegnimento dell'attacco stesso. La metaplasticità inibitoria rimane attiva, per un certo periodo di tempo, anche dopo la

fine dell'attacco, come dimostrato dal pattern di risposta di tipo inibitorio osservato nei pazienti valutati nel periodo postictale. Teoricamente, in questa fase del ciclo emicranico, meccanismi inibitori omeostatici di eccitabilità corticale potrebbero essere importanti per prevenire la recidiva precoce dei sintomi emicranici (Fig.6B).

Risposta motoria corticale in pazienti con emicrania cronica

I meccanismi fisiopatologici responsabili dell'evoluzione dell'emicrania episodica a emicrania cronica rimangono dibattuti. E' stata fornita evidenza sperimentale che un progressivo incremento di eccitabilità corticale potrebbe sottendere il processo di trasformazione dell'emicrania (Peres et al., 2004; Aurora et al., 2005; Coppola et al., 2012). Altri autori hanno inoltre suggerito il possibile ruolo di una disfunzione del tronco encefalico (Aurora et al., 2005; Lai et al., 2012) e dello sviluppo di una sensibilizzazione centrale (Meng et al., 2007; Filatova et al., 2008). Tutti questi meccanismi, anche congiuntamente, potrebbero essere responsabili di un circolo vizioso per cui la ricorrenza di attacchi abbassa progressivamente la soglia emicranica, rendendo in tal modo i pazienti con emicrania cronica particolarmente suscettibili all'insorgenza di crisi di emicrania.

Nel presente studio, sono state registrate nei pazienti con emicrania cronica risposte inibitorie del MEP durante i treni di rTMS a 5 Hz (Fig.1) che ricordano quelle registrate in pazienti in fase ictale e in pazienti con emicrania episodica con alta frequenza di attacchi valutati nel periodo interictale. Come nei pazienti con emicrania episodica, anche in pazienti con emicrania cronica il pattern di risposta inibitorio potrebbe essere espressione di una ridotta soglia per risposte omeostatiche inibitorie, con possibile significato protettivo nei confronti di una incrementata eccitabilità corticale. Inoltre, potremmo supporre che a causa di un eccessivo abbassamento della soglia per l'attacco emicranico, meccanismi inibitori

omeostatici potrebbero divenire inefficaci sia nel prevenire l'innesco di un attacco di emicrania che nel bloccarlo (Fig. 6B). Questa interpretazione è in linea con altri dati neurofisiologici che supportano l'idea di un persistente stato di eccitabilità di tipo ictale nei pazienti con emicrania cronica (Chen et al., 2011; Schoenen, 2011).

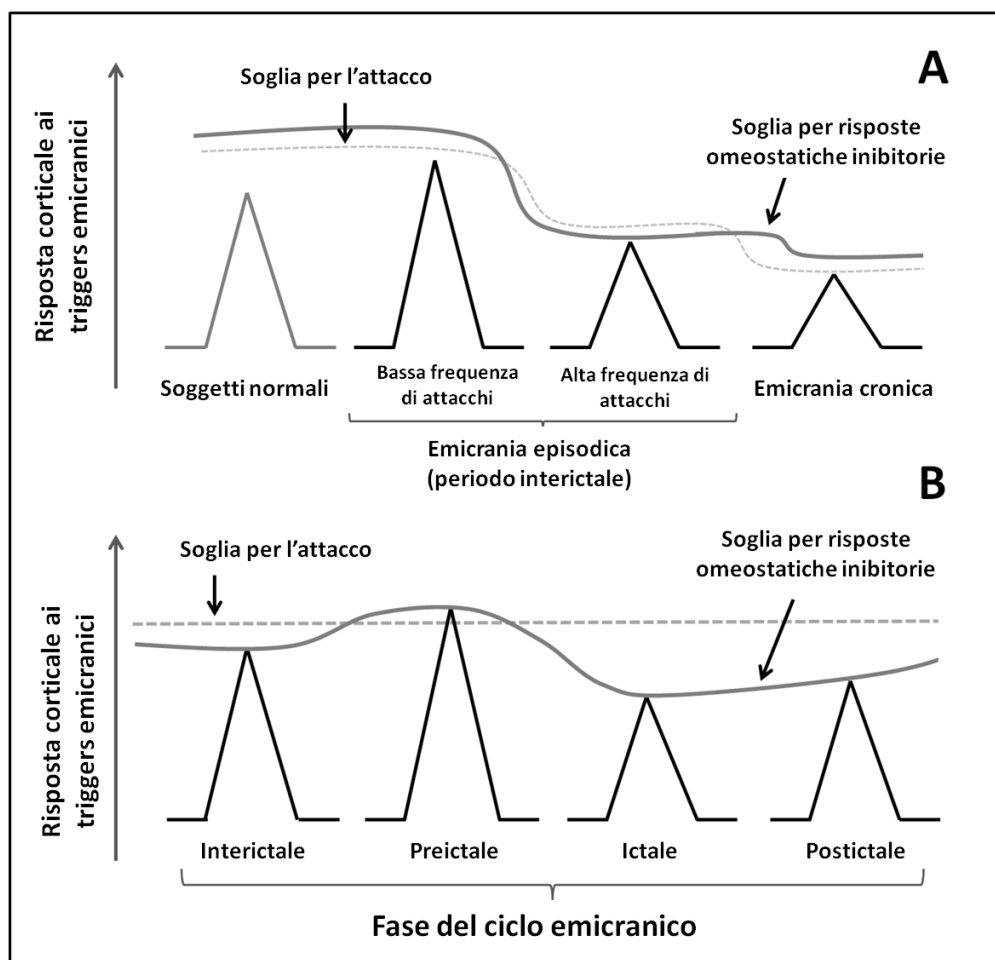


Figura. 6. *Rappresentazione schematica dei cambiamenti periodici ipotizzati nell'emicrania per la soglia dell'attacco emicranico e per quella necessaria all'elicitazione di risposte omeostatiche inibitorie. La soglia per l'attacco (linea tratteggiata) corrisponde ad un livello critico di attivazione corticale in grado di scatenare l'attacco. La soglia per l'elicitazione di risposte metaplastiche inibitorie (linea continua) corrisponde al livello di attivazione corticale necessario ad*

indurre risposte inibitorie omeostatiche a stimoli eccitatori che agiscono come fattori scatenanti (triggers) dell'emicrania. L'altezza dei triangoli rappresenta l'entità della risposta corticale a stimoli endogeni o esogeni (triggers) in grado di aumentare l'attività corticale in diversi sottogruppi di pazienti e soggetti sani di controllo.

(A) Nei soggetti normali, l'esposizione a fattori in grado di precipitare potenzialmente un attacco non permette il raggiungimento di un livello critico di attivazione corticale (non viene raggiunta la soglia emicranica). Invece, in pazienti con emicrania episodica a bassa frequenza di attacchi (attacchi sporadici), l'iperresponsività a stimoli sensoriali diversi può essere responsabile del più facile raggiungimento della soglia emicranica e quindi dello scatenarsi di un attacco. Il ripetersi degli attacchi emicranici induce un decremento nella soglia per attacchi successivi, portando ad una incrementata suscettibilità ai fattori precipitanti e quindi ad una più alta frequenza di attacchi. In pazienti con emicrania episodica ad alta frequenza di attacchi, la soglia per risposte metaplastiche inibitorie potrebbe ridursi, nel periodo intercritico, come meccanismo compensatorio, nel tentativo di prevenire il ripetersi di altri attacchi. In pazienti con emicrania cronica, un ulteriore decremento della soglia emicranica potrebbe spiegare il motivo per cui la metaplasticità inibitoria, seppur normalmente attiva, non è più in grado di impedire il raggiungimento della soglia emicranica in seguito all'esposizione a fattori trigger.

(B) Come mostrato precedentemente, la ricorrenza di attacchi a brevi intervalli di tempo potrebbe ridurre la soglia per le risposte omeostatiche inibitorie durante la fase interictale, possibilmente nel tentativo di compensare la progressiva riduzione della soglia emicranica. Tuttavia, in linea con le regole della metaplasticità corticale, la soglia per l'attivazione di risposte omeostatiche inibitorie tenderà ad

aumentare fino a valori normali quando il livello di attivazione corticale si riduce transitoriamente. Una tale condizione potrebbe essere responsabile, nel periodo preictale, di una incrementata sensibilità ai trigger emicranici e della vulnerabilità all'innescio di un attacco. Infatti, in una condizione di questo tipo i meccanismi omeostatici potrebbe non essere in grado di impedire ad eventuali fattori precipitanti l'attacco di attivare la corteccia fino al raggiungimento della soglia per l'attacco. Per finire, l'iperattività corticale responsabile dello scatenamento dell'attacco potrebbe indurre la brusca riduzione della soglia per risposte metaplastiche inibitorie, come osservato nelle fasi ictale e postictale. L'inibizione omeostatica della risposta corticale a stimoli sensoriali diversi potrebbe essere rilevante sia ai fini della fine dell'attacco che per la prevenzione della recidiva dei sintomi emicranici.

Conclusioni e considerazioni finali

E' necessario fare alcune considerazioni e menzionare alcuni limiti del presente studio. Prima di tutto, non sono state ottenute registrazioni dell'eccitabilità corticale nello stesso paziente in diversi periodi del ciclo emicranico. In linea teorica, infatti, uno studio di tipo longitudinale potrebbe essere più sensibile nel determinare i cambiamenti di eccitabilità corticale nelle diverse fasi di malattia, anche se uno studio di questo tipo sarebbe di difficile esecuzione a causa delle fluttuazioni di eccitabilità corticale legate al ciclo mestruale nelle pazienti di sesso femminile (Chen et al., 2009).

Un altro aspetto da considerare è il numero relativamente basso di pazienti valutati nel periodo peri-ictale. Infatti, anche se sono state registrate risposte dello stesso tipo in ogni sottogruppo di pazienti valutati nel periodo preictale, ictale e postictale, non possiamo escludere che diversi aspetti clinici potrebbero influenzare la risposta

corticale ai treni rTMS nel periodo peri-ictale. Studi mirati saranno pertanto necessari per chiarire questo aspetto, e inoltre per comprendere in che misura i risultati ottenuti sull'area motoria potrebbero essere generalizzabili a tutta la corteccia emicranica.

Per concludere, i presenti risultati supportano il concetto che una condizione di iperresponsività corticale potrebbe essere responsabile dell'aumentata suscettibilità all'attacco emicranico. Inoltre, in accordo con recenti evidenze inerenti il ruolo della metaplasticità in diversi disordini cerebrali (Hulme et al., 2013), i risultati di questo studio dimostrano come fluttuazioni della soglia per la metaplasticità inibitoria potrebbero spiegare il perché la suscettibilità ai triggers emicranici e la "disposizione neurofisiologica" a generare un attacco emicranico non sono costanti ma variano significativamente nel tempo. Se confermati da studi futuri, questi risultati potrebbero aprire nuove interessanti prospettive terapeutiche per il trattamento di forme di emicrania episodica e cronica.

Riferimenti bibliografici

Afra J, Cecchini AP, De Pasqua V, Albert A, Schoenen J. Visual evoked potentials during long periods of pattern-reversal stimulation in migraine. *Brain*. 1998a; 121 (Pt 2):233-41.

Afra J, Mascia A, Gérard P, Maertens de Noordhout A, Schoenen J. Interictal cortical excitability in migraine: a study using transcranial magnetic stimulation of motor and visual cortices. *Ann Neurol*. 1998b; 44(2):209-15.

Afra J, Proietti Cecchini A, Sándor PS, Schoenen J. Comparison of visual and auditory evoked cortical potentials in migraine patients between attacks. *Clin Neurophysiol.* 2000; 111(6):1124-9.

Afridi SK, Giffin NJ, Kaube H, Friston KJ, Ward NS, Frackowiak RS, Goadsby PJ. A positron emission tomographic study in spontaneous migraine. *Arch Neurol.* 2005; 62(8):1270-5.

Alam Z, Coombes N, Waring RH, Williams AC, Steventon GB. Plasma levels of neuroexcitatory amino acids in patients with migraine or tension headache. *J Neurol Sci.* 1998;156(1):102-6.

Ambrosini A, Rossi P, De Pasqua V, Pierelli F, Schoenen J. Lack of habituation causes high intensity dependence of auditory evoked cortical potentials in migraine. *Brain.* 2003; 126 (Pt 9):2009-15.

André-Obadia N, Mertens P, Gueguen A, Peyron R, Garcia-Larrea L. Pain relief by rTMS: differential effect of current flow but no specific action on pain subtypes. *Neurology.* 2008; 71(11):833-40.

Andreatta M, Puschmann AK, Sommer C, Weyers P, Pauli P, Mühlberger A. Altered processing of emotional stimuli in migraine: An event-related potential study. *Cephalalgia.* 2012; 32(15):1101-8.

Antal A, Lang N, Boros K, Nitsche M, Siebner HR, Paulus W. Homeostatic metaplasticity of the motor cortex is altered during headache-free intervals in migraine with aura. *Cereb Cortex*. 2008;18(11):2701-5.

Antic SD, Zhou WL, Moore AR, Short SM, Ikonomu KD. The decade of the dendritic NMDA spike. *J Neurosci Res*. 2010; 88(14):2991-3001.

Aurora SK, Ahmad BK, Welch KM, Bhardhwaj P, Ramadan NM. Transcranial magnetic stimulation confirms hyperexcitability of occipital cortex in migraine. *Neurology*. 1998; 50(4):1111-4.

Aurora SK, al-Sayeed F, Welch KM. The cortical silent period is shortened in migraine with aura. *Cephalalgia*. 1999a; 19(8):708-12.

Aurora SK, Cao Y, Bowyer SM, Welch KM. The occipital cortex is hyperexcitable in migraine: experimental evidence. *Headache*. 1999b; 39(7):469-76.

Aurora SK, Chronicle EP. Migraine's magnetic attraction. *Lancet Neurol*. 2002; 1(4):211.

Aurora SK, Barrodale P, Chronicle EP, Mulleners WM. Cortical inhibition is reduced in chronic and episodic migraine and demonstrates a spectrum of illness. *Headache*. 2005; 45(5):546-52.

Aurora SK, Barrodale PM, Tipton RL, Khodavirdi A. Brainstem dysfunction in chronic migraine as evidenced by neurophysiological and positron emission tomography studies. *Headache*. 2007; 47(7):996-1003.

Berardelli A, Inghilleri M, Rothwell JC, Romeo S, Currà A, Gilio F, Modugno N, Manfredi M. Facilitation of muscle evoked responses after repetitive cortical stimulation in man. *Exp Brain Res*. 1998; 122(1):79-84.

Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW. Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci*. 1982; 2:32-48.

Bigal ME, Serrano D, Reed M, Lipton RB. Chronic migraine in the population: burden, diagnosis, and satisfaction with treatment. *Neurology*. 2008; 71(8):559-66.

Bigal ME, Lipton RB. What predicts the change from episodic to chronic migraine? *Curr Opin Neurol*. 2009; 22(3):269-76.

Bjørk M, Stovner LJ, Hagen K, Sand T. What initiates a migraine attack? Conclusions from four longitudinal studies of quantitative EEG and steady-state visual-evoked potentials in migraineurs. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2011;(191):56-63.

Blumenfeld AM, Varon SF, Wilcox TK, Buse DC, Kawata AK, Manack A, Goadsby PJ, Lipton RB. Disability, HRQoL and resource use among chronic and

episodic migraineurs: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *Cephalalgia*. 2011; 31(3):301-15.

Bohotin V, Fumal A, Vandenheede M, Gérard P, Bohotin C, Maertens de Noordhout A, et al. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on visual evoked potentials in migraine. *Brain*. 2002; 125(Pt 4):912-22.

Bohotin V, Fumal A, Vandenheede M, Bohotin C, Schoenen J. Excitability of visual V1-V2 and motor cortices to single transcranial magnetic stimuli in migraine: a reappraisal using a figure-of-eight coil. *Cephalalgia*. 2003; 23(4):264-70.

Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*. 2002; 8(2):136-42.

Bolay H. The first phase of a migraine attack resides in the cortex. *J Neural Transm*. 2012; 119(5):569-74.

Borojerd B, Bushara KO, Corwell B, Immisch I, Battaglia F, Muellbacher W, et al. Enhanced excitability of the human visual cortex induced by short-term light deprivation. *Cereb Cortex*. 2000; 10(5):529-34.

Borojerd B, Battaglia F, Muellbacher W, Cohen LG. Mechanisms influencing stimulus-response properties of the human corticospinal system. *Clin Neurophysiol*. 2001; 112(5):931-7.

Brighina F, Piazza A, Daniele O, Fierro B. Modulation of visual cortical excitability in migraine with aura: effects of 1 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation. *Exp Brain Res.* 2002; 145(2):177-81.

Brighina F, Giglia G, Scalia S, Francolini M, Palermo A, Fierro B. Facilitatory effects of 1 Hz rTMS in motor cortex of patients affected by migraine with aura. *Exp Brain Res.* 2005; 161(1):34-8.

Brighina F, Palermo A, Fierro B. Cortical inhibition and habituation to evoked potentials: relevance for pathophysiology of migraine. *J Headache Pain.* 2009;10(2):77-84.

Brighina F, Palermo A, Daniele O, Aloisio A, Fierro B. High-frequency transcranial magnetic stimulation on motor cortex of patients affected by migraine with aura: a way to restore normal cortical excitability? *Cephalalgia.* 2010; 30(1):46-52.

Brighina F, Cosentino G, Vigneri S, Talamanca S, Palermo A, Giglia G, et al. Abnormal facilitatory mechanisms in motor cortex of migraine with aura. *Eur J Pain.* 2011; 15(9):928-35.

Brighina F, Cosentino G, Fierro B. Brain stimulation in migraine. *Handb Clin Neurol.* 2013;116:585-98.

Brigo F, Storti M, Nardone R, Fiaschi A, Bongiovanni LG, Tezzon F, et al. Transcranial magnetic stimulation of visual cortex in migraine patients: a systematic review with meta-analysis. *J Headache Pain*. 2012; 13(5):339-49.

Bruni O, Russo PM, Violani C, Guidetti V. Sleep and migraine: an actigraphic study. *Cephalalgia*. 2004; 24(2):134-9.

Cao Y, Aurora SK, Nagesh V, Patel SC, Welch KM. Functional MRI-BOLD of brainstem structures during visually triggered migraine. *Neurology*. 2002; 59(1):72-8.

Chadaide Z, Arlt S, Antal A, Nitsche MA, Lang N, Paulus W. Transcranial direct current stimulation reveals inhibitory deficiency in migraine. *Cephalalgia*. 2007; 27(7):833-9.

Chakravarty A. How triggers trigger acute migraine attacks: a hypothesis. *Med Hypotheses*. 2010; 74(4):750-3.

Chen R. Studies of human motor physiology with transcranial magnetic stimulation. *Muscle Nerve Suppl*. 2000; 9:S26-32.

Chen WT, Wang SJ, Fuh JL, Lin CP, Ko YC, Lin YY. Peri-ictal normalization of visual cortex excitability in migraine: an MEG study. *Cephalalgia*. 2009; 29(11):1202-11.

Chen WT, Wang SJ, Fuh JL, Lin CP, Ko YC, Lin YY. Persistent ictal-like visual cortical excitability in chronic migraine. *Pain*. 2011; 152(2):254-8.

Chen WT, Wang SJ, Fuh JL, Ko YC, Lee YC, Hämäläinen MS, et al. Visual cortex excitability and plasticity associated with remission from chronic to episodic migraine. *Cephalalgia*. 2012; 32(7):537-43.

Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders. *Cephalalgia* 2004; 24(Suppl 1):9-160.

Cohen LG, Roth BJ, Nilsson J, Dang N, Panizza M, Bandinelli S, et al. Effects of coil design on delivery of focal magnetic stimulation. Technical considerations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1990; 75(4):350-7.

Conte A, Barbanti P, Frasca V, Iacovelli E, Gabriele M, Giacomelli E, Aurilia C, Pichiorri F, Gilio F, Inghilleri M. Differences in short-term primary motor cortex synaptic potentiation as assessed by repetitive transcranial magnetic stimulation in migraine patients with and without aura. *Pain*. 2010; 148(1):43-8.

Coppola G, Vandenheede M, Di Clemente L, Ambrosini A, Fumal A, De Pasqua V, et al. Somatosensory evoked high-frequency oscillations reflecting thalamo-cortical activity are decreased in migraine patients between attacks. *Brain*. 2005; 128(Pt 1):98-103.

Coppola G, Pierelli F, Schoenen J. Is the cerebral cortex hyperexcitable or hyperresponsive in migraine? *Cephalalgia*. 2007a; 27(12):1427-39. Review.

Coppola G, Ambrosini A, Di Clemente L, Magis D, Fumal A, Gérard P, et al. Interictal abnormalities of gamma band activity in visual evoked responses in migraine: an indication of thalamocortical dysrhythmia? *Cephalalgia*. 2007b; 27(12):1360-7.

Coppola G, Pierelli F, Schoenen J. Habituation and migraine. *Neurobiol Learn Mem*. 2009; 92(2):249-59.

Coppola G, De Pasqua V, Pierelli F, Schoenen J. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on somatosensory evoked potentials and high frequency oscillations in migraine. *Cephalalgia*. 2012a; 32(9):700-9.

Coppola G, Schoenen J. Cortical excitability in chronic migraine. *Curr Pain Headache Rep*. 2012b; 16(1):93-100.

Cosentino G, Fierro B, Vigneri S, Talamanca S, Palermo A, Puma A, et al. Impaired glutamatergic neurotransmission in migraine with aura? Evidence by an input-output curves transcranial magnetic stimulation study. *Headache*. 2011; 51(5):726.

Cosentino G, Fierro B, Paladino P, Talamanca S, Vigneri S, Palermo A, et al. Transcranial direct current stimulation preconditioning modulates the effect of

high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in the human motor cortex. *Eur J Neurosci.* 2012; 35(1):119-24.

Cosentino G, Brighina F, Talamanca S, Paladino P, Vigneri S, Baschi R, et al. Reduced Threshold for Inhibitory Homeostatic Responses in Migraine Motor Cortex? A tDCS/TMS Study. *Headache.* 2013.

Cosentino G, Brighina F, Talamanca S, Paladino P, Vigneri S, Baschi R, Indovino S, Maccora S, Alfonsi E, Fierro B. Reduced threshold for inhibitory homeostatic responses in migraine motor cortex? A tDCS/TMS study. *Headache.* 2014;54(4):663-74.

D'Andrea G, Cananzi AR, Joseph R, Morra M, Zamberlan F, Ferro Milone F, et al. Platelet glycine, glutamate and aspartate in primary headache. *Cephalalgia.* 1991; 11(4):197-200.

D'Eufemia P, Finocchiaro R, Lendvai D, Celli M, Viozzi L, Troiani P, et al. Erythrocyte and plasma levels of glutamate and aspartate in children affected by migraine. *Cephalalgia.* 1997; 17(6):652-7.

De Marinis M, Pujia A, Natale L, D'arcangelo E, Accornero N. Decreased habituation of the R2 component of the blink reflex in migraine patients. *Clin Neurophysiol.* 2003; 114(5):889-93.

De Tommaso M. Laser evoked potentials in primary headaches and cranial neuralgias. *Expert Rev Neurother.* 2008; 8(9):1339-45.

Di Clemente L, Coppola G, Magis D, Fumal A, De Pasqua V, Di Piero V, et al. Interictal habituation deficit of the nociceptive blink reflex: an endophenotypic marker for presymptomatic migraine? *Brain*. 2007; 130(Pt 3):765-70.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Meglio M, Cioni B, Tamburrini G, Tonali P, et al. Direct demonstration of the effect of lorazepam on the excitability of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*. 2000; 111(5):794-9.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Berardelli A, Mazzone P, Insola A, Pilato F, Saturno E, Dileone M, Tonali PA, Rothwell JC. Direct demonstration of the effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on the excitability of the human motor cortex. *Exp Brain Res*. 2002; 144(4):549-53.

Evers S, Quibeldey F, Grotemeyer KH, Suhr B, Husstedt IW. Dynamic changes of cognitive habituation and serotonin metabolism during the migraine interval. *Cephalalgia*. 1999; 19(5):485-91.

Fumal A, Coppola G, Bohotin V, Gérardy PY, Seidel L, Donneau AF, et al. Induction of long-lasting changes of visual cortex excitability by five daily sessions of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in healthy volunteers and migraine patients. *Cephalalgia*. 2006; 26(2):143-9.

Filatova E, Latysheva N, Kurenkov A. Evidence of persistent central sensitization in chronic headaches: a multi-method study. *J Headache Pain*. 2008; 9(5):295-300.

Gerwig M, Niehaus L, Kastrup O, Stude P, Diener HC. Visual cortex excitability in migraine evaluated by single and paired magnetic stimuli. *Headache*. 2005; 45(10):1394-9.

Göder R, Fritzer G, Kapsokalyvas A, Kropp P, Niederberger U, Streng H, Gerber WD, Aldenhoff JB. Polysomnographic findings in nights preceding a migraine attack. *Cephalalgia*. 2001; 21(1):31-7.

Gunaydin S, Soysal A, Atay T, Arpaci B. Motor and occipital cortex excitability in migraine patients. *Can J Neurol Sci*. 2006; 33(1):63-7.

Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*. 1982; 218(4571):433-43.

Khalil NM, Legg NJ, Anderson DJ. Long term decline of P100 amplitude in migraine with aura. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000; 69(4):507-11.

Khedr EM, Ahmed MA, Mohamed KA. Motor and visual cortical excitability in migraineurs patients with or without aura: transcranial magnetic stimulation. *Neurophysiol Clin*. 2006; 36(1):13-8.

Kropp P, Gerber WD. Contingent negative variation during migraine attack and interval: evidence for normalization of slow cortical potentials during the attack. *Cephalalgia*. 1995; 15(2):123-8; discussion 78-9.

Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron*. 2007; 19;55(2):187-99.

Hamel E. Serotonin and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia*. 2007; 27(11):1293-300. Review.

Hansen JM, Bolla M, Magis D, de Pasqua V, Ashina M, Thomsen LL, et al. Habituation of evoked responses is greater in patients with familial hemiplegic migraine than in controls: a contrast with the common forms of migraine. *Eur J Neurol*. 2011; 18(3):478-85.

Hardingham GE, Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci*. 2003; 26(2):81-9.

Headache Classification Committee, Olesen J, Bousser MG, Diener HC, Dodick D, First M, Goadsby PJ, Göbel H, Lainez MJ, Lance JW, Lipton RB, Nappi G, Sakai F, Schoenen J, Silberstein SD, Steiner TJ. New appendix criteria open for a broader concept of chronic migraine. *Cephalalgia*. 2006; 26(6):742-6.

Hoogendam JM, Ramakers GM, Di Lazzaro V. Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. *Brain Stimul*. 2010; 3(2):95-118.

Hulme SR, Jones OD, Abraham WC. Emerging roles of metaplasticity in behaviour and disease. *Trends Neurosci*. 2013; 36(6):353-62.

Inghilleri M, Conte A, Frasca V, Gilio F, Lorenzano C, Berardelli A. Synaptic potentiation induced by rTMS: effect of lidocaine infusion. *Exp Brain Res.* 2005; 163(1):114-7.

Inghilleri M, Gilio F, Conte A, Frasca V, Marini Bettolo C, Iacovelli E, Gregori B, Prencipe M, Berardelli A. Topiramate and cortical excitability in humans: a study with repetitive transcranial magnetic stimulation. *Exp Brain Res.* 2006; 174(4):667-72.

Isope P. Short-term synaptic plasticity and the 'active calcium' hypothesis at a central synapse. *J Physiol.* 2013; 591(Pt 19):4681-2.

Judit A, Sándor PS, Schoenen J. Habituation of visual and intensity dependence of auditory evoked cortical potentials tends to normalize just before and during the migraine attack. *Cephalalgia.* 2000; 20(8):714-9.

Keel JC, Smith MJ, Wassermann EM. A safety screening questionnaire for transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol.* 2001; 112(4):720.

Lai TH, Fuh JL, Lirng JF, Lin CP, Wang SJ. Brainstem 1H-MR spectroscopy in episodic and chronic migraine. *J Headache Pain.* 2012; 13(8):645-51.

Lee MC, Yasuda R, Ehlers MD. Metaplasticity at single glutamatergic synapses. *Neuron.* 2010; 66(6):859-70.

Lisman JE. Three Ca²⁺ levels affect plasticity differently: the LTP zone, the LTD zone and no man's land. *J Physiol*. 2001; 532(Pt 2):285.

Lisman J, Spruston N. Postsynaptic depolarization requirements for LTP and LTD: a critique of spike timing-dependent plasticity. *Nat Neurosci*. 2005; 8(7):839-41.

Maertens de Noordhout A, Pepin JL, Schoenen J, Delwaide PJ. Percutaneous magnetic stimulation of the motor cortex in migraine. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1992; 85(2):110-5.

Main A, Dowson A, Gross M. Photophobia and phonophobia in migraineurs between attacks. *Headache*. 1997; 37(8):492-5.

Meng ID, Cao L. From migraine to chronic daily headache: the biological basis of headache transformation. *Headache*. 2007; 47(8):1251-8. Review.

Merabet LB, Theoret H, Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation as an investigative tool in the study of visual function. *Optom Vis Sci*. 2003; 80(5):356-68.

Martínez F, Castillo J, Rodríguez JR, Leira R, Noya M. Neuroexcitatory amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid during migraine attacks. *Cephalalgia*. 1993; 13(2):89-93.

Mochida S. Activity-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis and presynaptic short-term plasticity. *Neurosci Res*. 2011; 70(1):16-23.

Moskowitz MA, Buzzi MG, Sakas DE, Linnik MD. Pain mechanisms underlying vascular headaches. Progress Report. Rev Neurol (Paris). 1989; 145(3):181-93.

Moulder KL, Meeks JP, Mennerick S. Homeostatic regulation of glutamate release in response to depolarization. Mol Neurobiol. 2006; 33(2):133-53.

Mulleners WM, Chronicle EP, Palmer JE, Koehler PJ, Vredeveld JW. Suppression of perception in migraine: evidence for reduced inhibition in the visual cortex. Neurology. 2001; 23;56(2):178-83.

Nosedá R, Constandil L, Bourgeois L, Chalus M, Villanueva L. Changes of meningeal excitability mediated by corticotrigeminal networks: a link for the endogenous modulation of migraine pain. J Neurosci. 2010 Oct 27;30(43):14420-9.

Nosedá R, Burstein R. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. Pain. 2013 Dec;154 Suppl 1:S44-53.

Obrenovitch TP, Urenjak J, Wang M. Nitric oxide formation during cortical spreading depression is critical for rapid subsequent recovery of ionic homeostasis. J Cereb Blood Flow Metab. 2002; 22(6):680-8.

Oelkers R, Grosser K, Lang E, Geisslinger G, Kobal G, Brune K, Lötsch J. Visual evoked potentials in migraine patients: alterations depend on pattern spatial frequency. *Brain*. 1999; 122 (Pt 6):1147-55.

Oelkers-Ax R, Parzer P, Resch F, Weisbrod M. Maturation of early visual processing investigated by a pattern-reversal habituation paradigm is altered in migraine. *Cephalalgia*. 2005; 25(4):280-9.

Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol*. 2009; 8(7):679-90.

Ozkul Y, Uckardes A. Median nerve somatosensory evoked potentials in migraine. *Eur J Neurol*. 2002; 9(3):227-32.

Palermo A, Giglia G, Vigneri S, Cosentino G, Fierro B, Brighina F. Does habituation depend on cortical inhibition? Results of an rTMS study in healthy subjects. *Exp Brain Res*. 2011; 212(1):101-7.

Pascual-Leone A, Valls-Solé J, Wassermann EM, Hallett M. Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain*. 1994; 117 (Pt 4):847-58.

Peeters M, Gunthorpe MJ, Strijbos PJ, Goldsmith P, Upton N, James MF. Effects of pan- and subtype-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on cortical spreading depression in the rat: therapeutic potential for migraine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 321(2):564-72.

Peres MF, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Santos BF, Faulhaber MH. Cerebrospinal fluid glutamate levels in chronic migraine. *Cephalalgia*. 2004; 24(9):735-9.

Peurala SH, Müller-Dahlhaus JF, Arai N, Ziemann U. Interference of short-interval intracortical inhibition (SICI) and short-interval intracortical facilitation (SICF). *Clin Neurophysiol*. 2008; 119(10):2291-7.

Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(5):386-98.

Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75:365-91.

Ray PG, Meador KJ, Epstein CM, Loring DW, Day LJ. Magnetic stimulation of visual cortex: factors influencing the perception of phosphenes. *J Clin Neurophysiol*. 1998; 15(4):351-7.

Rossi P, Ambrosini A, Buzzi MG. Prodromes and predictors of migraine attack. *Funct Neurol*. 2005; 20(4):185-91.

Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A; Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol*. 2009; 120(12):2008-39.

Rossini PM, Rossi S. Transcranial magnetic stimulation: diagnostic, therapeutic, and research potential. *Neurology*. 2007; 68(7):484-8.

Rothwell JC. Techniques and mechanisms of action of transcranial stimulation of the human motor cortex. *J Neurosci Methods*. 1997; 74:113–221.

Sand T, Vingen JV. Visual, long-latency auditory and brainstem auditory evoked potentials in migraine: relation to pattern size, stimulus intensity, sound and light discomfort thresholds and pre-attack state. *Cephalalgia*. 2000; 20(9):804-20.

Sand T, Zhitniy N, White LR, Stovner LJ. Visual evoked potential latency, amplitude and habituation in migraine: a longitudinal study. *Clin Neurophysiol*. 2008; 119(5):1020-7.

Sándor PS, Afra J, Proietti-Cecchini A, Albert A, Schoenen J. Familial influences on cortical evoked potentials in migraine. *Neuroreport*. 1999; 10(6):1235-8.

Sándor PS, Dydak U, Schoenen J, Kollias SS, Hess K, Boesiger P, et al. MR-spectroscopic imaging during visual stimulation in subgroups of migraine with aura. *Cephalalgia*. 2005; 25(7):507-18.

Sanger TD, Garg RR, Chen R. Interactions between two different inhibitory systems in the human motor cortex. *J Physiol*. 2001; 530(Pt 2):307-17.

Schmitz N, Admiraal-Behloul F, Arkink EB, Kruit MC, Schoonman GG, Ferrari MD, van Buchem MA. Attack frequency and disease duration as indicators for brain damage in migraine. *Headache*. 2008; 48(7):1044-55

Schoenen J, Wang W, Albert A, Delwaide PJ. Potentiation instead of habituation characterizes visual evoked potentials in migraine patients between attacks. *Eur J Neurol*. 1995; 2:115-22.

Schoenen J. Abnormal cortical information processing between migraine attacks. In: Sandler M, Ferrari M, Harnett S. editors. *Migraine: Pharmacology and Genetics*. London: Altman. 1996; p. 233-53.

Schoenen J, Ambrosini A, Sandor PS, Maertens de Noordhout A. Evoked potentials and transcranial magnetic stimulation in migraine: published data and viewpoint on their pathophysiologic significance. *Clin Neurophysiol*. 2003; 114(6):955–72
Review.

Schoenen J. Is chronic migraine a never-ending migraine attack? *Pain*. 2011; 152(2):239-40.

Shin HC, Chapin JK. Mapping the effects of motor cortex stimulation on single neurons in the dorsal column nuclei in the rat: direct responses and afferent modulation. *Brain Res Bull*. 1989; 22: 245-252.

Shin HC, Chapin JK. Movement induced modulation of afferent transmission to single neurons in the ventroposterior thalamus and somatosensory cortex in rat. *Exp Brain Res.* 1990; 81: 515-522.

Siniatchkin M, Kropp P, Gerber WD, Stephani U. Migraine in childhood--are periodically occurring migraine attacks related to dynamic changes of cortical information processing? *Neurosci Lett.* 2000; 279(1):1-4.

Siniatchkin M, Kröner-Herwig B, Kocabiyik E, Rothenberger A. Intracortical inhibition and facilitation in migraine-a transcranial magnetic stimulation study. *Headache.* 2007; 47(3):364-70.

Siniatchkin M, Reich AL, Shepherd AJ, van Baalen A, Siebner HR, Stephani U. Peri-ictal changes of cortical excitability in children suffering from migraine without aura. *Pain.* 2009; 147(1-3):132-40.

Siniatchkin M, Sendacki M, Moeller F, Wolff S, Jansen O, Siebner H, et al. Abnormal changes of synaptic excitability in migraine with aura. *Cereb Cortex.* 2012; 22(10):2207-16.

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

Stovner Lj, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton R, Scher A, et al. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia.* 2007; 27(3):193-210.

Terao Y, Ugawa Y. Basic mechanisms of TMS. *J Clin Neurophysiol*. 2002; 19(4):322-43.

Thompson RF, Spencer WA. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev*. 1966; 73(1):16-43.

Turrigiano GG, Nelson SB. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2004; 5(2):97-107.

van der Kamp W, Maassen VanDenBrink A, Ferrari MD, Van Dijk JG. Interictal cortical hyperexcitability in migraine patients demonstrated with transcranial magnetic stimulation. *J Neurol Sci*. 1996; 139(1):106–10.

van der Kamp W, MaassenVanDenBrink A, Ferrari MD, van Dijk JG. Interictal cortical excitability to magnetic stimulation in familial hemiplegic migraine. *Neurology*. 1997; 48(5):1462-4.

van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, et al. A *Cacna1a* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*. 2004; 41(5):701-10.

Vikelis M, Rapoport AM. Role of antiepileptic drugs as preventive agents for migraine. *CNS Drugs*. 2010; 24(1):21-33

Vingen JV, Pareja JA, Støren O, White LR, Stovner LJ. Phonophobia in migraine. *Cephalalgia*. 1998; 18(5):243-9.

Wang W, Timsit-Berthier M, Schoenen J. Intensity dependence of auditory evoked potentials is pronounced in migraine: an indication of cortical potentiation and low serotonergic neurotransmission? *Neurology*. 1996; 46(5):1404-9.

Wang W, Wang GP, Ding XL, Wang YH. Personality and response to repeated visual stimulation in migraine and tension-type headaches. *Cephalalgia*. 1999; 19(8):718-24; discussion 697-8.

Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med*. 1995; 1(7):658-60.

Welch KM. Contemporary concepts of migraine pathogenesis. *Neurology*. 2003; 28;61(8 Suppl 4):S2-8.

Welch KM. Brain hyperexcitability: the basis for antiepileptic drugs in migraine prevention. *Headache*. 2005; 45 Suppl 1:S25-32.

Werhahn KJ, Wiseman K, Herzog J, Förderreuther S, Dichgans M, Straube A. Motor cortex excitability in patients with migraine with aura and hemiplegic migraine. *Cephalalgia*. 2000; 20(1):45-50.

Woodhouse A, Drummond PD. Mechanisms of increased sensitivity to noise and light in migraine headache. *Cephalalgia*. 1993; 13(6):417-21.

Ziemann U, Rothwell JC, Ridding MC. Interaction between intracortical inhibition and facilitation in human motor cortex. *J Physiol*. 1996; 496 (Pt 3):873-81.

Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*. 2002; 64:355-405.