



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI UDINE**

---

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE  
CLINICHE**

**Tesi di Dottorato**

**MODIFICAZIONI DELL'ECCITABILITA' E DELLA PLASTICITA'  
CORTICALE NEI PAZIENTI AFFETTI DA EMICRANIA CRONICA  
SOTTOPOSTI A TOSSINA BOTULINICA DI TIPO A**

**Coordinatore  
Chiar. mo Prof. Giuseppe Damante**

**Relatore  
Prof.ssa Mariarosaria Valente**

**Candidata  
Dott.ssa Valentina Russo**

---

Anno Accademico 2016-17

## **Elenco Abbreviazioni**

<b>BDNF</b>	<b>Brain-Derived Neurotrophic Factor</b>
<b>BoNTS</b>	<b>Tossine botuliniche</b>
<b>CAMP</b>	<b>Compound Action Motor Potential</b>
<b>DS</b>	<b>Doppio Stimolo</b>
<b>EC</b>	<b>Eemicrania Cronica</b>
<b>EMG</b>	<b>Elettromiografia</b>
<b>EPSPs</b>	<b>Excitatory Postsynaptic Potential</b>
<b>FANS</b>	<b>Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei</b>
<b>GGRP</b>	<b>Calcitonin Gene-Related Peptide</b>
<b>ICI</b>	<b>Intracortical Inhibition</b>
<b>ICF</b>	<b>Intracortical Facilitation</b>
<b>ISIs</b>	<b>Intervalli Interstimolo</b>
<b>LICI</b>	<b>Longlatency Intracortical Inhibition</b>
<b>LTD</b>	<b>Long Term Depression</b>
<b>LTP</b>	<b>Long Term Potentiation</b>
<b>MEP</b>	<b>Motor Evoked Potential</b>
<b>MIDAS</b>	<b>Migraine Disability Assessment</b>
<b>NGF</b>	<b>Nerve Growth Factor</b>
<b>NRS</b>	<b>Numeric Rating Scale</b>
<b>PAG</b>	<b>Periaqueductal Gray</b>
<b>pp-TMS</b>	<b>Paired Pulse -Transcranial Magnetic Stimulation</b>
<b>PSC</b>	<b>Periodo Silente Corticale</b>
<b>r-TMS</b>	<b>Ripetitive- Transcranial Magnetic Stimulation</b>
<b>SICI</b>	<b>Short interval intracortical facilitation</b>
<b>SNARE</b>	<b>SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema Nervoso Centrale</b>
<b>SNP</b>	<b>Sistema Nervoso Periferico</b>
<b>SS</b>	<b>Singolo Stimolo</b>
<b>TCMC</b>	<b>Tempo Conduzione Motoria Centrale</b>
<b>TES</b>	<b>Transcranial Electrical Stimulation</b>
<b>TMS</b>	<b>Transcranial Magnetic Stimulation</b>
<b>TNF</b>	<b>Tumor Necrosis Factor</b>
<b>VCM</b>	<b>Velocità conduzione motoria</b>

# INDICE

## **Introduzione**

- Stimolazione magnetica transcranica pag. 4
  - Tipi di coil ed effetti sul campo magnetico generato pag. 6
  - Generazione del potenziale pag. 8
  - Formazione del potenziale evocato motorio pag. 8
  - Tipi di stimolazione pag. 9
- Meccanismi di plasticità cerebrale
  - Concetti generali pag. 15
  - Meccanismi responsabili della plasticità corticale pag. 18
  - Plasticità nell'apprendimento: modifiche delle aree corticali in situazioni fisiologiche o patologiche pag. 21
- Eemicrania pag. 23
  - Fisiopatologia pag. 24
  - Fattori associati alla cronicizzazione dell'emigrania pag. 26
  - Diagnosi pag. 28
  - Terapia dell'emigrania con o senz'aura pag. 30
  - Terapia dell'emigrania cronica pag. 31
  - Terapia non farmacologica dell'emigrania cronica pag. 33

**Razionale dello studio** pag. 34

**Materiali e metodi** pag. 35

**Risultati** pag. 38

**Discussione** pag. 42

**Conclusioni** pag. 45

**Bibliografia** pag. 47

## INTRODUZIONE

### Stimolazione magnetica transcranica

#### Concetti generali

All'inizio degli anni ottanta Merton e Morton dimostrarono che una stimolazione elettrica ad alto voltaggio applicata sul cuoio capelluto era in grado di attivare la corteccia motoria. Da quel momento la stimolazione elettrica transcranica (TES) è stata ampiamente usata per studiare le vie nervose centrali motorie in soggetti sani e in pazienti affetti da patologie neurologiche (per esempio sclerosi multipla, ictus ecc). Tuttavia l'elevata resistenza esercitata del cuoio capelluto e dalle ossa fa sì che la maggior parte della corrente erogata fluisca attraverso la cute e i tessuti sottocutanei causando l'attivazione delle fibre nocicettive e la contrazione dei muscoli dello scalpo.

La stimolazione magnetica transcranica (TMS) fu inventata nel 1985 da Barker e rappresenta uno strumento non invasivo ed indolore per valutare l'eccitabilità e la plasticità corticale.

Con la TMS, grazie ad un campo magnetico generato in una bobina posta sullo scalpo, s'induce un campo elettrico a livello della corteccia cerebrale (legge di Faraday: una corrente elettrica in uno stimolatore produce un campo magnetico, e il cambio di campo magnetico induce un flusso di corrente nei conduttori vicini, inclusi i tessuti umani). Si genera quindi una depolarizzazione neuronale e conseguentemente dei potenziali d'azione motori (MEP); questi possono essere registrati con elettrodi di superficie posti su muscoli target.

La circolazione di una corrente impulsiva di elevata intensità all'interno del coil genera un campo magnetico di 1-2 Tesla che a sua volta induce una corrente impulsiva ad una distanza di 1-2 cm dalla superficie del coil nel momento in cui questo è posizionato su un secondo conduttore (scalpo)

Il campo magnetico è attenuato solo minimamente dai tessuti interposti (cute, osso, liquor), rispetto alla corrente elettrica.

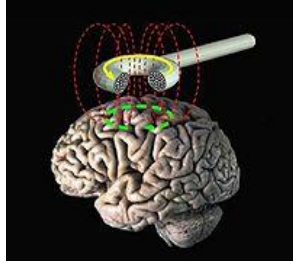


Fig1. Campo elettromagnetico indotto dalla TMS

Il variare del campo magnetico generato dalla variazione di corrente di per sé non ha alcun effetto sull'attivazione dei neuroni. Per generare a sua volta un flusso di corrente indotto all'interno del tessuto nervoso sono necessarie due condizioni: che il campo magnetico sia di intensità sufficiente e che il campo magnetico si modifichi in intensità in un tempo estremamente breve ( in presenza di un campo magnetico che si modifica lentamente o che è stazionario non c'è alcuna eccitazione del tessuto nervoso).

Lo stimolatore consiste in un trasduttore (coil) il quale è collegato a un sistema ad alto voltaggio (400V-3kV) e ad alta corrente (4kA-20kA) (Jalinous, 1991). Lo stimolatore produce un forte campo magnetico perpendicolare al coil. Il campo magnetico indotto raggiunge la massima intensità di 1-2,5 Tesla in un tempo molto breve (<1 ms.). Quando al coil si interpone un secondo conduttore (scalpo), al suo interno si genera un campo elettrico che è orientato perpendicolarmente al campo magnetico ed ha una direzione opposta rispetto a quella nel coil.

Poiché il cervello non è omogeneo e le correnti indotte e i loro percorsi nei tessuti intracranici sono distorte da differenze locali nella conduttività tissutale, la distribuzione esatta della corrente può essere solo predetta tramite dei modelli che considerano le proprietà elettriche dei tessuti in prossimità del coil (Yang et Al.,2006). Le differenze intracraniche nella conduttività elettrica sono rilevanti per l'uso diagnostico della TMS. Per stimolare effettivamente i neuroni corticali, il flusso di corrente nel tessuto deve produrre negli assoni corticali, un flusso transmembranale di ioni diretto esternamente sufficientemente forte da depolarizzare la membrana e quindi generare un potenziale d'azione. Inoltre la relazione spaziale tra la corrente tissutale indotta e gli assoni stimolati determina l'efficacia della TMS nell'indurre potenziali d'azione nei neuroni corticali. Una depolarizzazione effettiva della membrana avverrà preferenzialmente in quei siti dove le derivate spaziali e temporali del

campo elettrico indotto sono massime. E' stato evidenziato che l'inclinazione assonale è una caratteristica importante per determinare la suscettibilità dei neuroni corticali alla TMS (Maccabee,1993): la corrente elettrica indotta dalla TMS risulta in una depolarizzazione transmembrana diretta esternamente negli assoni suscettibili all'interno del campo. I potenziali d'azione indotti dalla TMS negli assoni corticali si diffondono agli altri neuroni per via sinaptica, generando una propagazione dell'attivazione neuronale alle aree corticali e subcorticali connesse (Groppa, 2012). Il potenziale eccitatorio viaggia lungo il tratto corticospinale ed i nervi motori periferici generando una risposta motoria che può essere registrata come MEP. E' importante ricordare che a livello neuronale, la stimolazione magnetica eccita i nervi attraverso lo stesso meccanismo della stimolazione elettrica convenzionale. La capacità di penetrazione della TMS è limitata in quanto il campo elettromagnetico indotto si attenua esponenzialmente con l'aumentare della distanza dal coil. Questo significa che l'intensità necessaria per effettuare la stimolazione dell'area motoria aumenta con l'aumentare della distanza tra il coil e l'area motoria. Perciò il coil va messo direttamente sullo scalpo con il piano orizzontale parallelo alla testa del soggetto; tale posizionamento minimizza la distanza tra il coil e la corteccia. In ogni caso tramite la TMS non è possibile eccitare le strutture nervose profonde quali la porzione mediale dei lobi temporali, il talamo o i gangli della base.

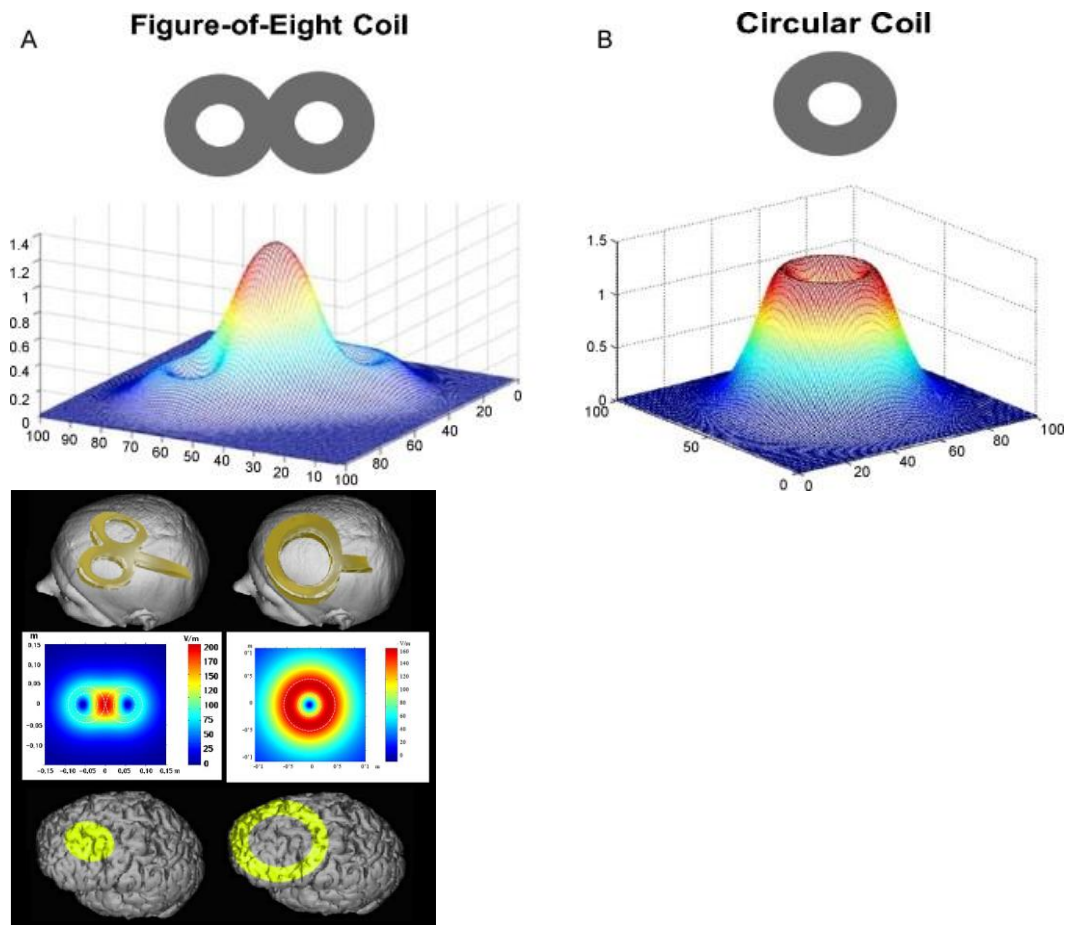
#### Tipi di coil e conseguenti effetti sul campo magnetico generato

La forma, la grandezza, l'orientamento del coil, così come la direzione della corrente, sono i principali fattori che determinano l'ampiezza dell'area stimolata.

Esistono coil di forma circolare o a otto (anche detto a farfalla); per il primo il campo elettrico indotto raggiunge la massima potenza corrisponde al bordo del coil. Una rappresentazione del campo magnetico può essere equiparata alla forma di un ananas rovesciato; è il bordo e non il centro del coil che deve essere posizionato al disopra della regione bersaglio. Il coil a farfalla permette invece una stimolazione più focale. Tale coil consiste in due coil circolari i quali sono posizionati uno accanto all'altro e collegati in modo che la corrente in ogni coil abbia una direzione opposta all'altra (Jalinous, 1991).

Questo tipo di coil produce la massima densità di corrente nei tessuti sottostanti l'intersezione tra i due coil generando un campo elettrico orientato parallelamente al punto di congiunzione tra i due coil. Quindi, in questo caso, è il centro del coil a dover essere posizionato sul punto da stimolare. La stimolazione relativamente selettiva che è possibile con il coil a farfalla è utile a livello sperimentale, qualora si voglia stimolare un'area ristretta per studiarne il funzionamento oppure quando si vuole stimolare un'area ristretta ad un'intensità medio-bassa.

E' possibile utilizzare uno speciale coil detto SHAM il quale è dotato di una piastra di metallo al disotto delle spire in modo da creare un click e una lieve contrazione muscolare molto simile a quelli ottenuti utilizzando un coil "regolare", senza che un impulso magnetico raggiunga il cervello. Anche se questo permette in una certa misura di controllare l'effetto placebo, per il paziente generalmente non è difficile notare la differenza tra stimoli reali e fittizi, dal momento che la sensazione sul cuoio capelluto e la contrazione muscolare sono meno forti in una bobina SHAM.



### Generazione del potenziale

La stimolazione elettrica della corteccia cerebrale genera due onde chiamate onda D e onda I registrabili con elettrodi a livello subdurale o intracerebrale. L'onda D deriva dall'attivazione diretta delle cellule neuronali, l'onda I si origina per attivazione sinaptica. Questo avviene sia utilizzando la TES che la TMS, ma con due differenze principali: con la TMS l'onda I è evocata a un'intensità minore di quella necessaria per l'onda D; con la TMS esiste inoltre una direzione preferenziale della corrente per determinare l'attivazione del sistema corticospinale (meglio se lo stimolo magnetico induce nel cervello una corrente elettrica con direzione poster-anteriore e perpendicolare al solco centrale).

Queste due principali differenze derivano a loro volta dalle differenze che ci sono tra il campo elettrico generato con la TES e quello generato con la TMS; in particolare con la TMS la corrente elettrica è sempre parallela alla superficie dell'encefalo, senza una componente perpendicolare. Ne deriva che la TMS determina l'attivazione neuronale principalmente in modo indiretto attraverso la via sinaptica.

### Formazione del potenziale evocato motorio

Il fatto che la TMS evochi un complesso di scariche ripetitive nella popolazione neuronale del tratto piramidale ha diverse implicazioni per quel che riguarda la risposta elettromiografica (EMG) che è evocata. Quest'ultima, infatti, differisce dal CMAP convenzionale prodotto tramite la stimolazione del nervo periferico per due caratteristiche importanti: primo, il potenziale evocato motorio è sempre più piccolo, di durata maggiore e più polifasico del CMAP; secondo, la latenza, l'ampiezza e la soglia del PEM cambiano a seconda che il paziente sia rilassato o attivato. Infatti, i potenziali prodotti dalla TMS che discendono lungo il tratto corticospinale generano dei potenziali postsinaptici eccitatori (EPSPs) nel motoneurone spinale, e questo potenziale si modifica nel giro di qualche millisecondo a seconda del numero di onde I che sono state generate. I motoneuroni scaricano in maniera asincrona, e questo provoca la maggiore durata del MEP, specialmente per alte intensità di stimolazione. Inoltre, ad interferire con l'ampiezza del MEP c'è anche il fenomeno di cancellazione di fase dovuto a unità motorie che scaricano in tempi leggermente diversi.



La diversa latenza del MEP evocato nel muscolo attivo e nel muscolo rilassato dipende dal tempo necessario perché il potenziale eccitatorio postsinaptico porti il potenziale di membrana oltre la soglia di attivazione e generi una depolarizzazione. A riposo un singolo EPSPs potrebbe non riuscire a raggiungere la soglia per generare un potenziale d'azione e quindi potrebbe essere necessario l'arrivo di un secondo potenziale I che come abbiamo detto arriva circa 1.5 ms dopo. Comunque, se lo stesso stimolo viene somministrato durante la contrazione volontaria del muscolo, ci sarà qualche motoneurone più vicino alla soglia di attivazione, e quindi vi sarà un potenziale d'azione già all'arrivo del primo impulso. Il MEP evocato durante la contrazione volontaria ha sempre una latenza più breve di quello evocato in un soggetto a riposo. Questo fattore è molto importante nel momento in cui andiamo a valutare dal punto di vista clinico, la latenza di un MEP in un paziente affetto da una qualche patologia neurologica.

### Tipi di stimolazione

La TMS prevede diverse modalità di esecuzione: a singolo stimolo (utile principalmente per la valutazione della funzionalità del fascio cortico-spinale e per il mappaggio corticale), a doppio stimolo (per valutare l'eccitabilità intra-corticale, la modulazione trans-callosale e la modulazione cerebello-corticale) e ripetitiva (utilizzata per modulare le funzioni corticali principalmente a fini terapeutici).

I parametri che consentono di avere delle informazioni sullo stato funzionale del sistema corticospinale e della conduzione dell'impulso lungo il fascio piramidale sono la latenza e l'ampiezza del MEP ed il tempo di conduzione motoria centrale (TCMC); i parametri che valutano l'eccitabilità corticale sono la soglia di attivazione motoria (a riposo o attiva), il periodo silente corticale, l'inibizione e la facilitazione intra-corticale al doppio stimolo.

La TMS è quindi una metodica strumentale che può fornirci informazioni in merito all'eccitabilità corticale, all'integrità funzionale di strutture neuronali intra-corticali, alla conduttività lungo fibre corticospinali, corticonucleari e callosali.

### Singolo stimolo

L'impulso consiste in una singola scarica erogata ad un'intensità variabile nei diversi protocolli di studio dal 105% al 180% del valore della soglia. Consente di ottenere informazioni sull'integrità del sistema corticospinale valutando i parametri descrittivi del MEP, quali latenza ed ampiezza, e tramite i valori del tempo di conduzione centrale e del periodo silente.

I parametri che caratterizzano il MEP consentono inoltre di valutare l'eccitabilità corticale (soglia, ampiezza e latenza del potenziale d'azione motorio, tempo di conduzione centrale) e la plasticità corticale (periodo silente corticale, inibizione e facilitazione interemisferica)

Ognuno di questi parametri può essere valutato in soggetti sani in condizioni basali o dopo il processo di apprendimento di una task motoria al fine di capire i meccanismi fisiologici che sono alla base della risposta neuronale a stimoli esterni. Se questi stessi parametri sono studiati in pazienti affetti da patologie neurodegenerative piuttosto che da disturbi del sonno, si può arrivare ad ipotizzare anche i possibili meccanismi fisiopatologici che sottendono tali malattie.

A differenza di quanto avviene quando si valuta un potenziale motorio periferico (CMAP, compound motor action potential), il MEP risente molto del grado di vigilanza, concentrazione e rilassamento del soggetto e, pertanto, sono possibili delle variazioni del MEP anche se questo è ottenuto con le stesse modalità di registrazione.

Per elicitare il MEP è necessario che lo stimolo erogato superi la soglia d'attivazione neuronale; pertanto la soglia di eccitabilità corticale viene definita come l'intensità di stimolo minima alla quale è possibile, in una sequenza di dieci stimoli, ottenere almeno in 50% dei MEP un'ampiezza superiore a 50  $\mu$ V. Il valore della soglia è differente se il muscolo è rilassato o contratto: in questo ultimo caso si assiste ad un fenomeno di facilitazione e il valore sarà più basso rispetto alla condizione di rilassamento. Sia situazioni fisiologiche, come per esempio l'età, lo stato di vigilanza, la chiusura e l'apertura degli occhi o l'immaginazione, che condizioni patologiche possono influenzare i valori di soglia; così come si verificano dei cambiamenti in seguito all'assunzione di farmaci che bloccano i canali voltaggio dipendenti del Na e del K, mentre non

si assiste ad alcuna modifica dei valori di soglia usando farmaci che agiscono sul sistema GABA-ergico.

L'ampiezza del MEP, misurata picco-picco, riflette il numero di motoneuroni attivati dallo stimolo e che sono responsabili della sua conduzione lungo il sistema corticospinale, ma bisogna considerare che tale parametro risente della dispersione del volley discendente a livello delle sinapsi spinali. Un parametro, che risente meno della dispersione temporale dell'impulso e che fornisce comunque un'indicazione del numero di motoneuroni attivati, è l'area sotto la curva (Rossi, 2009).

La latenza del MEP, cioè il tempo espresso in ms che intercorre tra lo stimolo e la comparsa del MEP, può essere fortemente influenzata dalla struttura fisica del paziente, in particolare dall'altezza, e da eventuali problematiche a carico dei nervi periferici; per avere quindi un parametro che valuti l'integrità del sistema motorio in termini di velocità di conduzione dell'impulso si preferisce ricorrere al tempo di conduzione motoria corticale (TCMC) che compensa tali possibili interferenze. IL TCMC stima il tempo di transizione dell'impulso dalla corteccia ai motoneuroni delle corna anteriori a livello del midollo spinale; può essere calcolato considerando la latenza dell'onda F e del CMAP o stimolando le radici motorie a livello del rachide. (Chen, 2008)

In un muscolo contratto il MEP indotto dalla TMS è immediatamente seguito da un silenzio elettrico della durata di 40-300 ms: periodo silente corticale (PSC). La parte iniziale del PSC riflette l'inibizione spinale, la seconda parte è l'espressione dell'inibizione corticale e ne determina la durata. Quest'ultimo parametro inoltre dipende dal muscolo valutato, dall'intensità dello stimolo e dall'assunzione di eventuali sostanze attive sul SNC, in particolare farmaci GABA-ergici. Verosimilmente la durata del PSC riflette la funzione dei recettori GABA<sub>B</sub>.

Nel soggetto sano è ormai assodato, quindi, che la soglia di attivazione corticale dipende dal grado di attenzione, vigilanza e tensione emotiva e che, così come per il TCC e per il PSC esiste una significativa differenza tra la

registrazione a riposo o durante contrazione volontaria o, ancora, durante l'immaginazione del movimento che porterebbe alla contrazione muscolare.

### Doppio stimolo

La tecnica del doppio stimolo (pp-TMS) consiste nell'erogazione, attraverso lo stesso coil di due stimoli magnetici appaiati con intervallo interstimolo di alcuni millisecondi. Il primo stimolo (S1, condizionante) precede il secondo stimolo (S2, stimolo test). L'effetto modulatore dello stimolo condizionante sullo stimolo test dipende dall'intensità degli stimolo e dall'intervallo che li separa.

Con il muscolo a riposo, uno stimolo condizionante sotto-soglia (70-80% della soglia motoria) determina un effetto inibitorio sul potenziale evocato motorio ottenuto da stimolo test (120-140% della soglia motoria) ad intervalli di 1-5 msec ed una facilitazione ad intervalli di 10-30 msec. Tale modulazione dell'ampiezza dello stimolo test è ridotta durante la contrazione muscolare.

Quando lo stimolo condizionante e lo stimolo test sono entrambi sopra soglia (120-140% della soglia motoria) si ottiene una fase di potenziamento ad intervalli 25-40 msec ed una fase di inibizione a 60-200 msec.

Si è recentemente dimostrato che variando l'intensità dello stimolo condizionante e dello stimolo test, si può mappare una complessa distribuzione di fasi di facilitazione e inibizione con il doppio stimolo a brevi intervalli di stimolo. E' possibile stimolare sia interneuroni inibitori sia eccitatori (generatori di onde I); per cui la comparsa di fenomeni di facilitazione o d'inibizione dipenderebbe dalla diversa soglia dei circuiti inibitori ed eccitatori a livello corticale.

Attraverso registrazioni epidurali a livello spinale che identificano le onde I e D, si è dimostrato la genesi intra-corticale dell'inibizione e della facilitazione da doppio stimolo.

Grazie alla pp- TMS è possibile studiare l'inibizione intra-corticale a breve latenza (SICI) per intervalli di 1-5 msec e la facilitazione intra-corticale (ICF) per intervalli di 10-30 msec e l'inibizione intra-corticale a lunga latenza (LICI) per intervalli di 60-200 msec.

Gli studi di modulazione farmacologica di questi fenomeni hanno permesso di ipotizzare quali siano i circuiti coinvolti nella loro patogenesi. La

SICI viene potenziata e l'ICI viene inibita da farmaci che aumentano l'attività dei recettori GABA<sub>A</sub> e da quelli che diminuiscono l'attività del sistema glutammatergico, mentre i farmaci che agiscono sui canali di membrana sono inefficaci su questi due parametri. La LICI è modulata da farmaci che agiscono sui recettori GABA<sub>B</sub>, come il baclofen. Pertanto numerose sostanze e farmaci quali L-Dopa, farmaci dopaminergici, catecolaminergici, antidepressivi e neurolettici hanno dimostrato un effetto sull'inibizione e/o facilitazione intra-corticale.

Nella generazione della SICI lo stimolo condizionante è sotto la soglia di attivazione motoria, e l'interazione avviene a livello corticale: lo stimolo condizionante è in grado di sopprimere il reclutamento delle vie discendenti da parte dello stimolo test. Quindi un piccolo stimolo condizionante che di per se non è in grado di produrre alcuna risposta è però in grado di sopprimere le onde I se l'intervallo tra gli stimoli è tra 1 e 5 ms. La soglia per ottenere un'inibizione intra-corticale a breve intervallo (SICI), cioè l'intensità minima di S1 necessaria a ridurre la risposta ad S2 è marcatamente bassa e si aggira intorno al 70% della soglia motoria a riposo per un determinato individuo.

L'inibizione intra-corticale a lunga latenza (LICI) prevede che lo stimolo condizionante sia d'intensità sufficiente a produrre un MEP nel muscolo target e sopprimere la risposta ad uno stimolo test di uguale intensità per intervalli interstimolo tra i 50 e i 200 ms. Dal momento che intervalli di tale lunghezza sono sufficienti a recuperare l'eccitabilità del riflesso H spinale tale fenomeno deve avere una genesi corticale. Tale teoria è stata confermata tramite la registrazione diretta dei potenziali discendenti (Di Lazzaro, 2004): S1 riduce l'ampiezza e il numero di onde I generate da uno stimolo S2 somministrato tra i 100 ms e i 150 ms di ritardo. Le onde I risultano invece facilitate per intervalli di 50 ms sebbene il MEP sia soppresso. Questo comportamento del MEP è probabilmente dovuto al fatto che i neuroni spinali si trovano ancora nel periodo refrattario in quanto hanno già subito una depolarizzazione in seguito allo stimolo S1.

La facilitazione intra-corticale (ICF) si ottiene quando i due stimoli sono erogati con un intervallo di tempo tra 6 e 15 ms; poiché per realizzarsi è necessaria una soglia d'attivazione maggiore rispetto alla SICI e, a differenza di quest'ultima è

sensibile alla direzione della corrente che induce S1 è ragionevole pensare che i meccanismi che causano i due fenomeni sono differenti.(Hallett 2005)

### Stimolazione magnetica ripetitiva

La stimolazione magnetica trans-cranica ripetitiva (r-TMS) permette di attivare le aree della corteccia motoria primaria attraverso treni d'impulsi che generano dei potenziali d'azione motori. L'effetto di tale attivazione può essere in senso inibitorio o eccitatorio con una durata variabile nel tempo. La direzione, la durata e la grandezza degli effetti condizionanti sono criticamente dipendenti dalle variabili della stimolazione. Tre fattori influenzano gli effetti della r-TMS: la frequenza, l'intensità e la durata dello stimolo. (Wasserman 2002)

Per convenzione una stimolazione a frequenza maggiore di 1 Hz è definita ad alta frequenza (high –frequency r-TMS), mentre una stimolazione minore o uguale a 1 Hz è detta a bassa frequenza (low- frequency r-TMS).

La rTMS a bassa frequenza è in grado di ridurre l'eccitabilità corticale (aumento della soglia, riduzione dell'ampiezza dei PEM) e tale effetto dura, dopo il termine degli impulsi, per un tempo variabile e correlato alla durata della stimolazione. Questo effetto è stato evidenziato sia nei soggetti sani che in pazienti affetti da malattie neurologiche, come per esempio le distonie. Oltre che un effetto inibitorio diretto sulla corteccia stimolata, diversi studi hanno documentato anche un'inibizione corticale delle aree interconnesse ed un effetto sulla corteccia motoria contro laterale.

L'effetto ottenuto sull'eccitabilità corticale con la r-TMS a bassa frequenza può diventare rilevante nel trattamento di numerose patologie psichiatriche e neurologiche in cui il meccanismo fisiopatologico induce un incremento dell'eccitabilità corticale, come per esempio la schizofrenia, la depressione, la distonia e l'epilessia.

La r-TMS ad alta frequenza ha un effetto opposto che risulta quindi in un aumento dell'eccitabilità corticale. Questo è vero se l'intensità dello stimolo è sopra soglia, infatti diversi studi che hanno utilizzato un'intensità uguale od inferiore alla soglia hanno messo in luce un effetto inibitorio subito dopo il termine della stimolazione. Non è ancora chiaro quali meccanismi e quali circuiti siano esattamente coinvolti in tali fenomeni, ma è verosimile che l'effetto eccitatorio sia legato all'incremento dell'efficacia sinaptica e quindi ci sia un

legame con il fenomeno della LTP; viceversa la riduzione dell'eccitabilità potrebbe essere legata alla LTD.

Con la r-TMS è possibile indurre dei cambiamenti nella facilitazione e nell'inibizione corticale che possono essere dimostrati utilizzando il paradigma del doppio stimolo rispettivamente con un ISI tra 10 e 20 msec e con un ISI < 6 msec.

Gli effetti della r-TMS sul periodo silente corticale (PSC) sono stati indagati in diversi studi esaminando l'effetto del numero d'impulsi, della frequenza e dell'intensità della stimolazione. Riassumendo si può affermare che la rTMS a 1 Hz riduce l'eccitabilità degli interneuroni e quindi accorcia il PS, viceversa la stimolazione ad alta frequenza determina un allungamento del PS. (Wasserman 2001)

## **Meccanismi di plasticità cerebrale**

### Concetti generali

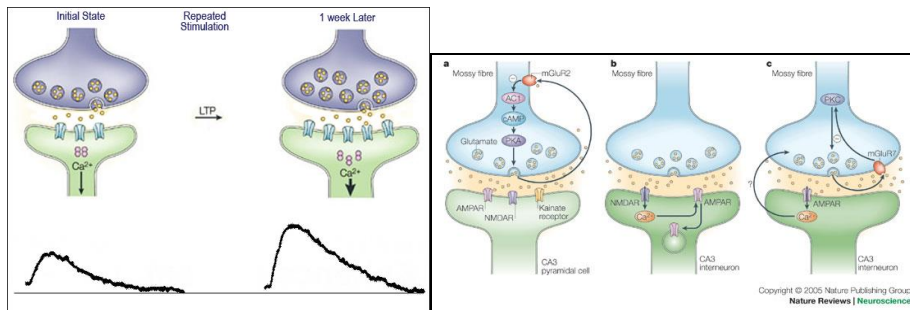
Ormai è una cosa ampiamente risaputa che l'organizzazione funzionale della corteccia cerebrale è plastica, e che, dei cambiamenti nell'organizzazione corticale avvengono durante tutta la vita di una persona in risposta sia ad esperienze normali che patologiche. Questa capacità di riorganizzarsi è stata dimostrata sia nella corteccia motoria che sensitiva di soggetti adulti, come conseguenza di traumi, processi patologici, esposizione a particolari input sensitivi o apprendimento.

I cambiamenti avvengono a vari livelli di organizzazione neuronale, dalle molecole alle sinapsi, alle reti neuronali. Esempi di plasticità cerebrale sono i meccanismi di riparazione e di organizzazione delle connessioni neuronali, come l'utilizzazione di vie alternative funzionalmente omologhe ma anatomicamente distinte da quelle danneggiate, la sinaptogenesi, l'arborizzazione dendritica, il rinforzo secondario all'esperienza di connessioni sinaptiche precedentemente esistenti sul piano strutturale, ma silenti funzionalmente.

Per valutare questi cambiamenti è necessario fare riferimento ad un'estesa base di studi sperimentali i quali hanno identificato un pattern di rappresentazione riproducibile (es delle diverse regioni del corpo, delle diverse frequenze sonore, delle diverse parti della retina) nelle quali è quindi possibile

rilevare dei cambiamenti. Ci sono ormai conoscenze schiacciati che le modifiche che accadono nella corteccia cerebrale vengono generate da cambiamenti nella capacità della sinapsi di generare potenziali post sinaptici eccitatori o inibitori di maggiore ampiezza (efficacia sinaptica) che avvengono all'interno della corteccia ed in altre regioni del sistema nervoso centrale. Inoltre questi cambiamenti sono stati correlati in maniera forte a quei fenomeni comunemente definiti long-term potentiation (LTP) e long-term depression (LTD).

Alcune delle evidenze più importanti circa l'influenza che l'apprendimento e la pratica hanno sull'organizzazione corticale e che l'apprendimento opera tramite dei meccanismi mediati da LTP/D derivano da studi eseguiti sulla corteccia motoria. I risultati di tali studi implicano che anche una corteccia motoria mal funzionante o che ha subito dei danni può andare incontro a dei processi di riparazione attraverso una riabilitazione fisica corretta e tramite tecniche neurofisiologiche e di stimolazione corticale le quali possono alterare i meccanismi che sono alla base della LTP/D.



La topografia funzionale della corteccia motoria primaria può essere modificata da lesioni a livello centrale e periferico, stimolazione elettrica, manipolazione farmacologica o tramite l'esperienza. La riorganizzazione della mappa dell'area motoria indotta tramite tecniche comportamentali o sperimentali è caratterizzata dallo spostamento della zona di rappresentazione di una determinata zona del corpo rispetto alle altre.

Per esempio, le rappresentazioni motorie vanno incontro ad una rapida riorganizzazione nel corso già di qualche ora di distanza da una lesione di un nervo periferico. Per esempio, successivamente ad una sezione completa del



nervo facciale nei topi è stato rilevato che stimolando l'area corticale che precedentemente presiedeva al controllo dei muscoli della faccia, venivano invece generati dei movimenti a livello dell'avambraccio, indicando quindi che la corteccia deputata a processare un determinato tipo di informazioni può subire rapidamente delle modifiche che le permettono di processare informazioni di diverso tipo.

E' altrettanto evidente che un danno ad un nervo sensitivo può alterare la mappa motoria. In questi casi, i territori corticali adiacenti alle zone ormai silenti dal punto di vista funzionale tendono ad estendersi in tale zona. Cambiamenti simili possono essere generati da cambiamenti di posizione protratti di un arto portando a concludere che i feedback sensitivi sono particolarmente importanti nel determinare l'estensione della rappresentazione corticale di un segmento corporeo.

Di recente nel topo è stato rilevato un ampliamento della rappresentazione motoria dell'arto superiore quale risultato dell'azione di crisi epilettiche ripetute che hanno quindi provocato un aumento dell'efficacia sinaptica.

I network corticali sembrano quindi dotati di un substrato anatomico predisposto a rispondere in maniera flessibile ad una moltitudine di rappresentazioni. Le fibre orizzontali formano un network di connessioni a lungo e a breve raggio all'interno della corteccia. Queste fibre si diffondono tangenzialmente lungo gli strati corticali e formano una via diffusa che fornisce connessioni eccitatorie ad ampie aree della corteccia. Quest'organizzazione diffusa renderebbe possibile il collegamento funzionale di aree estese di corteccia. La via intra-corticale più estesa sembra essere presente negli strati II/III e forma un ampio sistema di proiezione. Gli esperimenti eseguiti sui topi supportano la conclusione che le connessioni orizzontali diffuse nell'area motoria rappresentano un substrato favorente la plasticità. Le rappresentazioni motorie possono essere modificate tramite una variazione dell'equilibrio esistente tra l'eccitazione e l'inibizione. Il ruolo delle connessioni orizzontali nel supportare le rappresentazioni a livello della corteccia motoria è anche evidenziato dallo specifico pattern di riorganizzazione presente dopo una lesione ad un nervo; per esempio una lesione a livello del nervo facciale produce una rapida riorganizzazione nelle aree del volto e dell'avambraccio là dove sono presenti numerose connessioni orizzontali, mentre la

riorganizzazione non avviene in quei siti dove le connessioni orizzontali sono meno presenti.

### Meccanismi responsabili della plasticità corticale

S'ipotizza che diversi meccanismi possano essere coinvolti nella genesi della plasticità corticale sia a livello di popolazione cellulare sia a livello di singola cellula. I meccanismi implicati nella plasticità "precoce" sono l'attivazione o la riattivazione di connessioni latenti, l'attivazione di sinapsi esistenti ma ancora silenti, la plasticità sinaptica dipendente dall'esercizio, o cambiamenti generalizzati dell'eccitabilità nei neuroni postsinaptici. I cambiamenti morfologici quali la neurogenesi, la sinaptogenesi, o il rimodellamento sinaptico richiedono un tempo maggiore per esprimersi pienamente e quindi, potrebbero essere coinvolti piuttosto nel generare nuovi spazi per ulteriori cambiamenti; ci sono evidenze a supporto della maggior parte di questi meccanismi sia durante lo sviluppo del SN sia durante l'apprendimento o la risposta a lesioni. In più questi meccanismi non si escludono vicendevolmente e quindi potrebbero agire in tempi diversi.

La riattivazione di connessioni preesistenti all'interno dell'area motoria potrebbe rappresentare un meccanismo di risposta rapida sia ad input sensitivi che ad output motori. Un meccanismo alternativo o ulteriore di plasticità precoce è l'attivazione di sinapsi esistenti ma ancora silenti. Le sinapsi silenti sono connessioni interneuronali le quali non mostrano alcuna risposta AMPA-mediata al glutammato: il rilascio quindi del neurotrasmettitore da parte del terminale presinaptico non genera nel neurone bersaglio alcun potenziale. Il "risveglio" delle sinapsi silenti a seguito dell'inserimento di recettori postsinaptici AMPA viene proposto quale meccanismo per spiegare il rapido aumento nell'efficacia sinaptica che è stato osservato sperimentalmente. Le sinapsi silenti sono state implicate nella plasticità corticale sia di animali giovani che adulti; c'è una forte evidenza della presenza di sinapsi silenti nel SN in via di sviluppo che poi andrebbero via via a ridursi nel corso della maturazione per essere rimpiazzate da sinapsi attive.

Il meccanismo più studiato a supporto della plasticità della rappresentazione corticale è la LTP sebbene non sia ancora universalmente accettato il legame tra cambiamenti comportamentali e funzione sinaptica. Negli

ultimi trent'anni è stata dimostrata una forte evidenza del possibile ruolo della LTP nell'apprendimento e nella memoria; diversi studi mostrano come LTP e LTD operano in maniera congiunta durante l'apprendimento per modificare l'efficacia sinaptica. Alcune forme di apprendimento portano a delle modifiche nelle risposte sinaptiche in numerose strutture encefaliche e recentemente è stato dimostrato che LTP è coinvolta nell'apprendimento di nuove capacità motorie ed è un meccanismo coinvolto nell'apprendimento fisiologico. Un grande sforzo è stato compiuto nel tentativo di chiarire in quale misura la LTP è coinvolta nella genesi della memoria arrivando a dimostrare che a livello ippocampale si assiste in alcune settimane ad una progressiva perdita dell'effetto della LTP e parallelamente si assiste ad una perdita di memoria. Nell'area motoria tali effetti sembrano invece persistere nel tempo confermando il maggiore effetto della LTP a livello corticale. I cambiamenti nell'eccitabilità neuronale rappresentano un altro fattore che può determinare la plasticità corticale, ma è relativamente meno specifico dei meccanismi simili alla LTP in quanto i cambiamenti dell'eccitabilità post sinaptica alterano la risposta di quel neurone a tutti gli input sinaptici. È stato dimostrato che nel condizionamento classico potrebbe esserci a livello dei neuroni della corteccia motoria un aumento generalizzato e di lunga durata dell'eccitabilità dei neuroni post-sinaptici.

I meccanismi descritti finora riguardano le modificazioni a carico di sinapsi esistenti che quindi sono disponibili immediatamente all'interno del network di fibre orizzontali.

L'esperienza, però, può produrre nuove connessioni attraverso la sinaptogenesi e la neurogenesi.

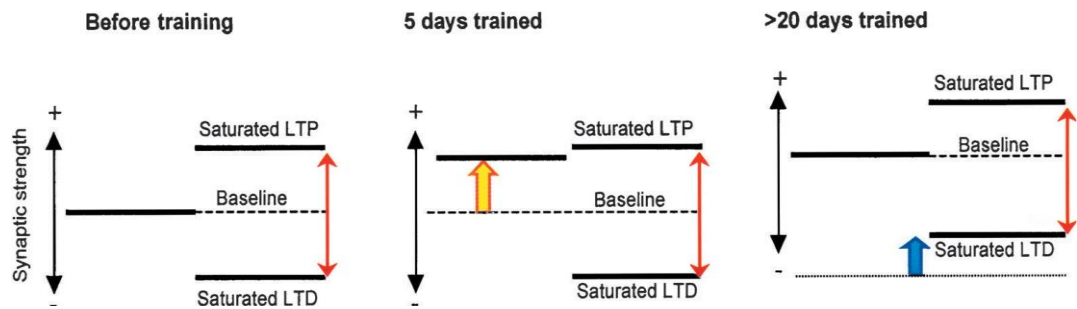
Tradizionalmente si pensava che la neocorteccia dei primati adulti fosse stabile dal punto di vista strutturale e che non fosse possibile la formazione di nuove sinapsi e di nuovi neuroni che era invece possibile soltanto durante lo sviluppo. Tale plasticità strutturale è stata riscontrata anche nel bulbo olfattorio dei vertebrati adulti e nell'ippocampo dei primati e degli uomini; in modo particolare nell'ippocampo sembrerebbe essere legata all'apprendimento e all'esecuzione di compiti associativi. Invece la formazione di nuove sinapsi o il rimodellamento di quelle esistenti potrebbe anche essere coinvolto nei meccanismi di apprendimento e memoria; in particolare l'apprendimento di

abilità motorie aumenterebbe il numero complessivo di sinapsi nella corteccia motoria e nel cervelletto, così come l'esposizione ad un ambiente ricco di stimoli provoca un aumento del numero delle sinapsi e un aumento della densità degli apici sinaptici.

Studi in vitro permettono la valutazione delle connessioni locali in condizioni controllate e misurando parametri intra ed extracellulari. E' quindi possibile definire la forza sinaptica come i cambiamenti del potenziale transmembrana a livello postsinaptico in risposta al potenziale presinaptico; la forza sinaptica dipende dal numero e dalla grandezza degli apici sinaptici. L'utilizzo di farmaci ha mostrato che le connessioni eccitatorie orizzontali sono principalmente glutammatergiche con componenti AMPA più rapide e di ampiezza maggiore rispetto alle componenti NMDA che viceversa sono più lente e di ampiezza minore.

A seguito di queste considerazioni teoriche è stato dimostrato che se c'è un meccanismo attività dipendente in grado di aumentare la forza sinaptica, dovrebbe esserci anche un meccanismo in grado di ridurla in modo da mantenere costante il grado di attivazione della sinapsi e da evitare un aumento eccessivo della potenza che potrebbe condurre alla saturazione della sinapsi. La relazione tra rinforzo sinaptico prodotto dalla stimolazione elettrica (LTP) e l'apprendimento e memoria è stata ampiamente esaminata nell'ippocampo; l'ipotesi quindi che LTP sia necessaria per l'apprendimento è stata valutata sia tramite la saturazione dei circuiti sia tramite il blocco farmacologico della LTP.

Si presuppone che entrambi questi approcci possano condurre ad un blocco nell'apprendimento. In accordo con l'ipotesi del legame tra LTP ed apprendimento, la saturazione dell'efficacia sinaptica determina un'interruzione di LTP e quindi blocca ogni ulteriore apprendimento. Per valutare questo risultato bisogna considerare che le popolazioni sinaptiche hanno un range di operatività, denominato "synaptic modification range", esiste pertanto un tetto massimo e un valore minimo all'interno del quale possono funzionare.



Boniface and Ziemann: Plasticity in the human nervous system (2009)

Sperimentalmente si è visto che dopo 5 giorni di esercizio si ottiene un aumento della forza sinaptica che si avvicina al limite massimo del range di operatività rendendo impossibile un aumento della LTP e quindi dell'apprendimento; proseguendo l'allenamento assistiamo a valori di forza sinaptica stabili e ad uno spostamento verso l'alto dei valori del "synaptic modification range", tale shift consente nuovamente l'aumento della forza sinaptica e quindi di ricominciare l'apprendimento.

*Plasticità nell'apprendimento: modifiche delle aree corticali in situazioni fisiologiche o patologiche (mappaggi corticali con TMS).*

Nel corso dello sviluppo del cervello avvengono numerosi processi estremamente complicati al fine di creare un network intricato ma estremamente specifico di milioni di cellule interconnesse da miliardi di arborizzazioni dendritiche e sinapsi.

Data l'immensa complessità di questi processi e il risultato "finale", fino a circa un decennio fa era ragionevole pensare che il cervello, una volta completato lo sviluppo, fosse resistente ai cambiamenti. Gli studi recenti hanno viceversa dimostrato che l'encefalo è una struttura in continua riorganizzazione. E' più corretto quindi pensare alla plasticità come ad una proprietà intrinseca del SN umano che persiste nella vita di un individuo. L'encefalo è infatti progettato per modificarsi in risposta ai cambiamenti che avvengono nell'ambiente e quindi durante l'apprendimento l'encefalo deve modificarsi per essere capace di codificare e implementare in modo corretto le nuove conoscenze.

Cambiamenti plastici possono essere anche indotti da un grande numero di condizioni patologiche incluse lesioni al SNC e SNP; in tali casi la plasticità è un meccanismo che può permettere il recupero dopo la lesione ma è importante considerare che a livello neuronale il concetto di plasticità non implica dei cambiamenti a livello comportamentale e non implica necessariamente un recupero funzionale. E' ragionevole pensare che la plasticità del SNC sia una caratteristica che si è evoluta per rispondere ai cambiamenti ambientali legati all'apprendimento e che si attiva in modo secondario in risposta ad un danno encefalico. Questi meccanismi quindi non si sono evoluti in modo specifico per rispondere ad una lesione e possono pertanto non essere efficaci nella risposta al danno.

Volendo dare una definizione intuitiva di plasticità possiamo dire che con tale termine si intendono quei processi che, partendo da una condizione di base, generano dei cambiamenti misurabili e osservabili, funzionali o strutturali, a livello del SN. La situazione è comunque molto più complessa poiché l'encefalo non è mai a riposo e quindi, qualsiasi esperimento non parte da una situazione stabile, ma ogni evento presente si combina con eventi passati per generarne dei nuovi. Sarebbe meglio pensare al SN come ad un sistema in movimento nel quale la plasticità è una proprietà intrinseca ma anche una conseguenza obbligata di ogni input sensitivo, comando motorio, impulso gratificante, azione pianificata o consapevolezza. In questo contesto non è più utile immaginare i processi psicologici come distinti dalle funzioni o dalle disfunzioni su base organica: il comportamento porta a dei cambiamenti nei circuiti dell'encefalo una volta che si stabilisce la base organica delle attitudini apprese e delle caratteristiche cognitive, così come delle specifiche trasformazioni dei circuiti portano a determinati pattern comportamentali.

La plasticità non deve essere necessariamente di beneficio per i soggetti. I cambiamenti plastici potrebbero quindi portare ad un guadagno ma anche ad una perdita comportamentale nel soggetto e potrebbero sottendere lo sviluppo dei sintomi in una specifica patologia. Il concetto di "plasticità mal adattativa" fu introdotto per definire l'esistenza di conseguenze della plasticità potenzialmente non desiderate dal punto di vista funzionale; in ogni caso l'idea di un collegamento obbligato tra la plasticità e l'adattamento potrebbe essere non corretto. Potrebbe essere più appropriato pensare alla plasticità come la

conseguenza obbligata dell'attivazione di ogni circuito neurale; in questo modo diventerebbe ovvio separare i cambiamenti nell'encefalo dal fine adattativo.

Attraverso le tecniche di mappaggio corticale tramite TMS, si è dimostrato che nel corso dell'apprendimento di un compito motorio la soglia di attivazione delle aree corticali dei muscoli flessori ed estensori delle dita si riduce costantemente e le dimensioni della rappresentazione corticale di tali muscoli aumentano significativamente. Questo implica che l'acquisizione di capacità motorie è associata a cambiamenti nel pattern d'attivazione corticale. Eventualmente con l'ulteriore miglioramento delle performance altre strutture neuronali (incluse le strutture subcorticali) acquisiscono un ruolo prominente nell'esecuzione del compito. Di conseguenza, con l'automatizzazione del compito, dopo l'iniziale modulazione flessibile e a breve termine della corteccia motoria, avvengono dei cambiamenti strutturali a lungo termine nei networks intra-corticali e subcorticali. Tale riorganizzazione plastica è guidata sia dagli input afferenti che dagli output del soggetto. Comunque un sistema capace di una tale riorganizzazione nasconde in se i rischi di cambiamenti non voluti, quindi possiamo postulare che un apprendimento errato potrebbe risultare in un riarrangiamento corticale non voluto e rappresentare il punto di partenza per dei problemi nel controllo della motricità come ad esempio nella distonie compito specifiche.

## **Emicrania**

L'emicrania è una delle cause più frequenti di cefalea primaria, colpisce prevalentemente le donne (F:M= 5:1), con un'età media di insorgenza compresa tra i 20 e i 30 anni. L'emicrania è distinta in due sottotipi maggiori: emicrania senza aura, sindrome clinica caratterizzata da cefalea con aspetti peculiari e sintomi associati, ed emicrania con aura, caratterizzata da sintomi neurologici focali che generalmente precedono, ma talora accompagnano la fase algica. Alcuni pazienti presentano, inoltre, una fase premonitrice, che avviene ore o addirittura giorni prima della comparsa del dolore, e una fase di risoluzione. I sintomi tipici della fase premonitrice e di risoluzione sono rappresentati da iperattività, ipoattività, depressione dell'umore, ricerca di cibi particolari, sbadigli ripetuti.

Si tratta di una malattia complessa caratterizzata da una condizione di disfunzione neuro vascolare che rende il soggetto particolarmente vulnerabile a numerosi fattori in grado di precipitare i suoi attacchi (Moulton, 2011). Questi possono ripetersi più o meno frequentemente nel corso della vita sia per condizioni di ridotta “soglia emicranica”, sia per l’intervento di fattori d’innesco di particolare intensità e/o frequenza.

La componente genetica influenza la soglia individuale per gli attacchi emicranici. Alla vulnerabilità individuale ereditata, tuttavia, si sovrappongono una serie di determinanti ambientali che condizionano l’espressione fenotipica del disturbo a seconda del genere maschile/femminile, dell’età, dello stile di vita, della reattività neuroendocrina ecc. Tra i fattori precipitanti vanno ricordati le fluttuazioni ormonali, il ritmo sonno-veglia, i fattori psicosociali (per esempio lo stress o i disturbi ansioso depressivi), l’utilizzo di sostanze vasoattive.

L’emicrania cronica (EC) è una patologia fortemente disabilitante, sottostimata e non trattata che colpisce circa il 2% della popolazione. Le terapie che usualmente si utilizzano per curare l’emicrania episodica, sia terapia per l’attacco acuto che terapie di profilassi, non hanno la stessa efficacia se utilizzate nella terapia della EC. Questo perché l’emicrania episodica e la EC sono probabilmente due forme differenti di malattia, ed in particolare la EC è caratterizzata da alterazioni strutturali del sistema nervoso centrale indotte dal dolore cronico.

### Fisiopatologia

Il mantenimento di una sensibilizzazione del sistema trigemino-vascolare, fenomeno alla base della fase dolorosa dell’emicrania, sembra essere il meccanismo fisiopatologico alla base della cronicizzazione. Gli stessi eventi fisiopatologici che si verificano durante un attacco emicranico determinano, in una stimolazione reiterata delle terminazioni nervose trigeminali, il mantenimento di una facilitazione della trasmissione nocicettiva al nucleo caudale del trigemino. Un ruolo chiave nel mantenimento del dolore cronico e nel determinismo della cascata di eventi che aumentano la suscettibilità dei neuroni agli stimoli nocicettivi è giocato dal legame del TNF



alfa con lo specifico recettore neuronale trigeminale. Nel liquor di pazienti con emicrania cronica refrattaria sono stati dimostrati alti livelli di TNF alfa .

La cascata di eventi che determina l'anormale eccitabilità neuronale e la sensitizzazione dei neuroni sensitivi trigeminali ed extratrigeminali nel processo di cronicizzazione è determinata dal rilascio reiterato di CGRP, SP ed NGF con successiva liberazione di BDNF e glutammato che a loro volta attivano i recettori del glutammato ionotropici e metabotropici del nucleo caudale del trigemino (Pirelli) con potenziamento e mantenimento della stimolazione nocicettiva. La disfunzione dei sistemi antinocicettivi endogeni (serotoninergico ed endocannabinoide) gioca anch'esso un ruolo importante nella reiterata trasmissione nocicettiva trigeminale ( Apkarian, 2011; Schoenen, 2003).

Un ridotto controllo sulle vie discendenti dolorifica e analgesica endogena potrebbe essere causato da una progressiva deposizione di ferro a livello della sostanza grigia periacqueduttale (PAG). I processi di alterata trasmissione nocicettiva sono influenzati anche dall'allodinia cutanea che si rileva nella maggior parte dei pazienti, diversamente dalle forme episodiche, a suggerire che i neuroni del complesso nucleare trigeminale sono cronicamente sensibilizzati. I fenomeni di allodinia cutanea sono bilateralmente rilevati, inoltre, durante la fase intercritica in oltre il 70% dei pazienti con cefalea cronica.

Nei pazienti con emicrania cronica nell'ambito di un'anomala processazione dei pattern distintivi dell'elaborazione corticale del dolore vi è una prevalente attivazione della porzione rostrale della corteccia cingolata anteriore che potrebbe contribuire alla predisposizione alla cronicizzazione del dolore come hanno dimostrato studi di risposte nocicettive a stimolo laser.

La dimostrazione, poi, nella corteccia cingolata anteriore, nell'amigdala sinistra, nell'opercolo parietale sinistro, nel giro frontale medio e anteriore sinistro, nel giro frontale inferiore destro e l'insula bilateralmente (aree coinvolte nella processazione dell'informazione dolorifica e nella componente emozionale del dolore) di una riduzione della sostanza grigia nelle forme croniche rispetto a quelle episodiche ha fatto ipotizzare un disordine progressivo legato all'accumulo del danno dovuto al ripetersi degli attacchi.

L'emicrania è quindi uno stato di diseccitabilità neuronale latente, da cui derivano tutte le anomalie elettrofisiologiche che si riscontrano in corso di crisi

dolorosa e nelle ore precedenti o successive all'episodio. Dal punto di vista fisiopatologico l'instabilità neuronale, di fatto, è alla base del fenomeno noto con il termine di "spreading depression" da cui consegue la successiva attivazione del sistema trigemino vascolare.

L'ipereccitabilità dei neuroni della corteccia cerebrale, unitamente al deficit della funzione dell'adattamento, è la principale caratteristica del cervello emicranico. Diversi studi di neuroscienze hanno permesso una più approfondita conoscenza dei meccanismi di base delle cefalee ed in particolare dell'emicrania, identificando le regioni cerebrali coinvolte nel trasmettere l'insorgenza del dolore emicranico e dei sintomi associati. Da questi studi, infatti, è emerso che meccanismi di modulazione cerebrale modificano l'ipersensibilità visiva, olfattiva e al dolore nei pazienti emicranici.

L'attivazione delle afferenze sensitive trigeminali si associa a liberazione locale di neuro peptidi e alla formazione di ossido nitrico, sostanze che conducono alla vasodilatazione e all'aumento della permeabilità vascolare nella così detta infiammazione neurogena; successivamente si assiste a modifiche biochimiche e di flusso ematico, ma anche l'insorgenza d'impulsi nocicettivi lungo le afferenze viscerali che raggiungono il nucleo caudale del trigemino.

L'importanza dei meccanismi tronco encefalici nella patogenesi dell'attacco emicranico è stata dimostrata usando la PET in corso di attacchi. Si è evidenziata un'attivazione tronco encefalica contro laterale alla sede del dolore, riferibile al grigio periacqueduttale (nucleo dorsale del rafe) e alla parte dorso laterale del ponte (locus ceruleus). Quest'ultimo costituisce il principale nucleo noradrenergico del sistema nervoso centrale, esercita quindi un'azione di vasocostrizione sul circolo cerebrale e un'azione modulatrice sulla permeabilità della barriera ematoencefalica. Il dolore quindi deriva sia da una sensibilizzazione periferica che centrale.

#### Fattori associati alla cronicizzazione dell'emicrania

La trasformazione dell'emicrania episodica in EC presenta delle caratteristiche distintive. In primo luogo la progressione è graduale, non avviene all'improvviso: si parte da una condizione di cefalea a bassa frequenza per

passare ad una ad elevata frequenza per poi arrivare ad una forma cronica. Inoltre la trasformazione non è irreversibile.

Sulla base di diversi studi epidemiologici e genetici i fattori di rischio per la progressione dell'emicrania possono essere distinti in imm modificabili, modificabili e putativi.

Tra i primi troviamo: l'età, il sesso femminile, la razza bianca, il basso livello di scolarizzazione, lo stato socio economico e i fattori genetici. (Lipton, 2009)

Tra i fattori modificabili troviamo: frequenza degli attacchi, abuso di farmaci sintomatici, abuso di caffeina, ipertensione arteriosa, obesità, disturbi del sonno, comorbidità psichiatrica.

Per quanto riguarda la frequenza degli attacchi è già stato illustrato come episodi ripetuti di dolore possano portare a una sensibilizzazione centrale, con generazione di radicali liberi e cambiamenti strutturali nelle aree che controllano il dolore, con conseguente maggiore predisposizione ad ulteriore dolore.

L'eccessivo uso di medicinali sintomatici è considerato un fattore di rischio per la cronicizzazione dell'emicrania, ma è comunque necessario che alla base il soggetto presenti una predisposizione all'emicrania. Infatti, l'eccessivo uso di farmaci non è causa di cefalea ex-novo in pazienti che non avevano già un'emicrania preesistente e, viceversa, gli individui che soffrono di emicrania se assumono dosi eccessive di analgesici per altre ragioni è più probabile che sviluppino emicranie frequenti.

L'eccessivo uso di caffeina (sia contenuta nella dieta che come sostanza analgesica in alcune formulazioni medicinali) è associato con un maggior rischio di sviluppare emicrania cronica; così come la brusca sospensione di caffeina in pazienti con emicrania cronica porta ad una cefalea da rimbalzo.

L'ipertensione è correlata a un maggior rischio di trasformazione in EC. Nell'emicrania si verificano sia un aumento dei fattori vasocostrittori che una disfunzione endoteliale. E' possibile che l'ipertensione amplifichi tali effetti sulla parete vascolare apportando un ulteriore danno endoteliale. Le alterazioni che

ne conseguono, anche a livello di flusso cerebrale, potrebbero portare alla spreading depression corticale e avere effetti sul sistema trigeminovascolare. Ciò causa un aumento della frequenza, severità e durata degli attacchi emicranici.

Diversi studi hanno dimostrato che l'indice di massa corporea è associato alla frequenza degli attacchi negli emicranici e che l'obesità è un fattore aggravante per l'emicrania e non per la cefalea in generale. Infatti molti mediatori infiammatori che sono aumentati nei soggetti obesi sono importanti nella fisiopatologia dell'emicrania, inclusi interleuchine e il CGRP. Inoltre nell'obesità si ha un'attivazione del sistema simpatico che riducendo il tono serotoninergico potrebbe portare ad un aumento della frequenza della cefalea.

Tra i disturbi del sonno è emersa una correlazione tra la sindrome delle apnee ostruttive e la cronicizzazione dell'emicrania anche se i meccanismi non sono del tutto chiari, ma potrebbero dipendere da fluttuazioni della pressione arteriosa ed intracrainica.

Infine ci sono dei fattori per i quali si sta ancora cercando di valutare la reale implicazione nella cronicizzazione e fra questi ricordiamo l'allodina cutanea (percezione di dolore dopo stimoli non dolorosi) e la predisposizione genetica che è ben riconosciuta per quanto riguarda la forma episodica ma non per il rischio di cronicizzazione.

## Diagnosi

L'attuale classificazione dell'International Headache Society, l'International Classification of Headache Disorders (ICHD-III Beta, 2013), distingue l'emicrania in 3 sottotipi principali: emicrania senza aura, emicrania con aura, emicrania cronica; rientrano nella classificazione anche le complicanze dell'emicrania (stato emicranico, aura persistente senza infarto, infarto emicranico ed epilessia indotta dall'emicrania) e le sindromi episodiche

Prevede inoltre un sesto sottotipo definito emicrania probabile, che include le forme di emicrania senza e con aura e di emicrania cronica che soddisfano tutti i rispettivi criteri diagnostici tranne uno.

Secondo tali criteri classificativi la diagnosi di emicrania senz'aura viene formulata se il paziente presenta almeno 5 attacchi che della durata di 4-72 ore e che soddisfino i criteri B-D

B. La cefalea presenta almeno due delle seguenti caratteristiche:

1. localizzazione unilaterale
2. tipo pulsante
3. dolore con intensità media o forte
4. aggravata da o che limiti le attività fisiche di routine (per es., camminare, salire le scale)

C. Alla cefalea si associa almeno una delle seguenti condizioni:

1. presenza di nausea e/o vomito
2. presenza di fotofobia e fonofobia

D. Non attribuita ad altra condizione o patologia

L'emicrania con aura si manifesta con attacchi caratterizzati da sintomi neurologici focali che generalmente si sviluppano gradualmente nell'arco di 5-20 minuti e durano per meno di 60. La cefalea, con le caratteristiche dell'emicrania senza aura, generalmente segue i sintomi dell'aura. Meno frequentemente la cefalea non ha i requisiti tipici dell'emicrania o è addirittura assente.

Si parla di **emicrania cronica** quando gli attacchi di cefalea si presentano con una frequenza  $\geq 15$  giorni/mese per almeno 3 mesi.

Secondo l'ICHD-3Beta si può porre diagnosi di emicrania cronica quando sono rispettati i seguenti criteri:

A. Cefalea (di tipo tensivo e/o emicranico) per almeno 15 giorni/mese da almeno 3 mesi che soddisfino i criteri B e C

B. Cefalea che si manifesta in un paziente che abbia almeno 5 attacchi che soddisfino i criteri B-D per Emicrania senza aura e/o i criteri B e C per Emicrania con aura.

C. Cefalea che soddisfi per almeno 8 giorni/mese per almeno 3 mesi almeno uno dei seguenti criteri:

1. criteri C- D per Eemicrania senza aura
2. criteri B e C per Eemicrania con aura
3. cefalea che il paziente ritenga di tipo emicranico al suo esordio ed alleviato dal trattamento con un triptano o un derivato dell'ergot

D. Cefalea non meglio inquadrata da altra diagnosi ICHD-3.

La necessità di distinguere la forma cronica da quella episodica nasce dal fatto che è impossibile distinguere episodi individuali di cefalea in pazienti con cefalee così frequenti. Le caratteristiche della cefalea possono variare non soltanto di giorno in giorno, ma persino nell'arco della stessa giornata. E' molto difficile mantenere questi pazienti privi di trattamenti sintomatici e molti sviluppano anche una cefalea da abuso di farmaci.

#### Terapia dell' emicrania con o senz'aura

Quando si parla di terapia dell'emicrania con o senz'aura bisogna distinguere la terapia sintomatica dell'attacco dalla terapia di profilassi.

La prima ha come bersaglio il sistema trigemino vascolare e si basa sull'utilizzo di farmaci antiinfiammatori o di triptani; questi ultimi sono agonisti della serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT), specificamente dei recettori 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>1B</sub>, che agiscono sulla costrizione dei grandi vasi cranici. Al contempo inibiscono il rilascio dei neuropeptidi infiammatori e i terminali nervosi perivascolari del sistema del trigemino.

Invece l'azione di profilassi si esercita sui sistemi centrali di controllo e sui generatori o modificatori tronco-diencefalici della soglia di attacco dell'emicrania. Viene utilizzata nei pazienti che presentano attacchi frequenti, disabilitanti e resistenti alle terapie sintomatiche. Le classi di farmaci che possono essere utilizzate sono: antiepilettici (valproato, topiramato, lamotrigina nelle forme con aura emicranica), betabloccanti (propranololo, metoprololo), calcio-antagonisti (flunarizina), antidepressivi (amitriptilina).

Per minimizzare il rischio di eventi avversi ed ottimizzare la compliance del paziente il trattamento di profilassi deve essere iniziato a basse dosi con un singolo farmaco. Si aumentano lentamente le dosi fino ad ottenere gli effetti terapeutici in assenza o con il minimo di effetti collaterali, mantenendo il trattamento per almeno 6 mesi.

La terapia di prevenzione si definisce efficace se determina una riduzione del 50% o più degli attacchi, sia in termini di frequenza mensile che d'intensità. In Italia da marzo del 2013, nei pazienti affetti da emicrania cronica farmaco resistente (nei quali cioè sono state provate altre terapie di profilassi senza successo o mal tollerate dal paziente) è possibile utilizzare come terapia di profilassi anche la tossina botulinica.

#### Terapia dell'emicrania cronica

Un ambito a parte, per la difficoltà di successo terapeutico legato al meccanismo fisiopatologico sottostante, è rappresentato dall'emicrania cronica.

Si tratta di un approccio multidisciplinare che deve tener conto anche del trattamento/gestione di tutti i fattori che contribuiscono alla cronicizzazione dell'emicrania che sono in qualche misura modificabili (stress, disturbi dell'umore, roncopia, ipertensione arteriosa, diabete mellito, obesità)

Va precisato che i pazienti che presentano una cefalea da abuso di farmaci sintomatici, prima o all'inizio della terapia di profilassi, devono essere sottoposti ad un ciclo di disintossicazione di almeno 6 giorni che implica la sospensione dei farmaci abusati, il controllo della cefalea con farmaci sintomatici non coinvolti nell'abuso, adeguata idratazione ed eventuale somministrazione di steroidi e benzodiazepine.

Per quanto riguarda le strategie farmacologiche a nostra disposizione in diversi studi il topiramato è risultato essere efficace nella terapia dell'emicrania cronica portando ad una riduzione significativa della frequenza mensile dei giorni di emicrania. Evidenze meno stringenti sono disponibili per altri farmaci antiepilettici quali il valproato di sodio, il gabapentin e la zonisamide (linee guida SISC,2011).

Dal 2010 in USA e dal 2013 in Italia, è stata data indicazione all'utilizzo

della tossina botulinica di tipo A nel trattamento di profilassi dell'EC anche associata ad iperuso di farmaci. Il trattamento prevede infiltrazioni pericraniche secondo un protocollo standardizzato (studio PREEMPT). Le dosi di tossina botulinica variano da 150 Unità (trattamento di minima) a 200 Unità (possono essere infiltrati i così detti punti aggiuntivi nel caso in cui il paziente lamenti un dolore maggiormente localizzato a livello temporale o nucale). Le sedute sono eseguite ad almeno dodici settimane di distanza l'una dall'altra.

Esistono 7 sierotipi di tossine botuliniche (BoNTs), il sierotipo A è stato quello più estesamente studiato e utilizzato in clinica. Si tratta di una neurotossina con una elevata affinità per le sinapsi colinergiche, in grado di bloccare il rilascio di acetilcolina da queste terminazioni nervose. Il complesso proteico di 150 kDa delle BoNTs è composto da una catena leggera e una pesante, collegate da un ponte disolfuro. La catena pesante è responsabile dell'internalizzazione della tossina nei terminali presinaptici colinergici. La catena leggera, invece, è una zinco endopeptidasi responsabile degli effetti tossici. Alcuni studi biochimici hanno dimostrato che queste proteine sono proteasi altamente specifiche che tagliano le proteine presinaptiche SNARE (Soluble NSF Attachment protein receptors), coinvolte nel processo di esocitosi delle vescicole sinaptiche nei terminali nervosi.

La distruzione di queste proteine presinaptiche è la base dell'azione di blocco delle BoNTs del rilascio dei neurotrasmettitori.

Diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato che la tossina botulinica è in grado di interferire con il dolore cronico, incluso quello cefalico sebbene il meccanismo d'azione non sia ancora del tutto chiarito. Inizialmente si riteneva che il beneficio derivasse dal diretto effetto che la tossina ha a livello della giunzione neuromuscolare (si blocca il rilascio di acetilcolina e quindi c'è la riduzione dell'attività muscolare). Ci si è però accorti che molti pazienti riferivano un miglioramento dei sintomi prima che avvenissero gli effetti muscolari del farmaco; si è quindi pensato che la tossina potesse avere un effetto centrale sul controllo del dolore.

La specificità delle BoNTs per i terminali colinergici *in vivo* è dovuta alla presenza di specifici recettori o accettori nella membrana delle terminazioni nervose motorie. Alternativamente, è stato osservato in modelli sperimentali che l'internalizzazione delle BoNTs nelle terminazioni nervose inibisce



immediatamente l'esocitosi di altri neurotrasmettitori, coinvolti nella trasmissione o modulazione dell'informazione nocicettiva, come la norepinefrina (Baltazar, 2000), il glutammato (Verderio, 2004), GABA monoamine (Murakamiet, 2001), e il meccanismo di azione sembra essere lo stesso osservato nelle sinapsi colinergiche, nonché il taglio del complesso SNARE.

Nonostante siano necessari ulteriori studi per delucidare i meccanismi coinvolti nell'azione inibitoria, è possibile affermare che le BoNTs possono interrompere il segnale del dolore in almeno quattro possibili modalità: 1) normalizzando l'iperattività muscolare, 2) normalizzando l'eccessiva attività del fuso muscolare, 3) attraverso un flusso retrogrado verso il SNC, e 4) inibendo il rilascio di neuropeptidi dai nocicettori, sia nel tessuto periferico che nel SNC (Aoki, 2005; Gobel, 2001).

E' stata finora ipotizzata un'inibizione al rilascio di neurotrasmettitori correlati alla nocicezione, quali la sostanza P, il CGRP e il glutammato. Migliorando la sensibilizzazione periferica si ha di conseguenza un effetto anche sulla componente centrale.

### Terapia non farmacologica dell'emicrania cronica.

Numerose tecniche non farmacologiche sono state utilizzate per la terapia dell'emicrania cronica con beneficio. Tra queste le più efficaci sono risultate la terapia cognitivo comportamentale, i blocchi anestetici del nervo grande occipitale e la stimolazione del nervo grande occipitale.

Per quanto riguarda la terapia cognitivo-comportamentale si è evidenziato che consente ai pazienti di gestire efficacemente lo stress e particolari situazioni psicologiche che sono fattori favorenti la cronicizzazione dell'emicrania. I pazienti imparano a riconoscere i fattori cognitivi e comportamentali che provocano la comparsa della cefalea, o il suo peggioramento, e a gestirli, con un marcato miglioramento della sintomatologia. Nella pratica clinica viene in genere utilizzata associata al training di rilassamento e al biofeedback.

Dati non ancora definitivi, ma che fanno ipotizzare un'efficacia terapeutica, emergono anche dagli studi condotti sulla r-TMS (Lefaucheur, 2008).

## **RAZIONALE DELLO STUDIO-OBIETTIVI**

Nella genesi dell'attacco emicranico sono coinvolti meccanismi di disregolazione neuronale e l'efficacia della tossina botulinica di tipo A nel trattamento di profilassi è dovuta verosimilmente ad un'azione centrale.

Inoltre è noto che pazienti affetti da dolore cronico presentano un sovvertimento dei network nocicettivi sia di tipo funzionale che talvolta strutturale.

Si vuole quindi valutare se nei pazienti affetti da EC in corso di trattamento si verificano dei cambiamenti di eccitabilità e plasticità cerebrale che potrebbero essere alla base della risposta clinica o se viceversa, indipendentemente dal risultato clinico, le eventuali alterazioni neurofisiologiche persistono.

Abbiamo voluto confrontare le risposte dei pazienti affetti da emicrania cronica con quelle ottenute applicando lo stesso protocollo di stimolazione ai pazienti affetti da emicrania senz'aura.

## MATERIALI E METODI

La popolazione di studio è costituita da 11 pazienti affetti da emicrania cronica (due maschi, nove femmine) e da 6 soggetti affetti da emicrania senz'aura (un maschio e cinque femmine)

I pazienti sono stati selezionati tra chi accedeva al nostro ambulatorio dedicato alla cefalea nel periodo compreso tra luglio 2013 e gennaio 2016.

Sono stati esclusi dallo studio i soggetti che presentavano controindicazioni all'esecuzione della TMS, pazienti affetti da cefalea che non rispondeva ai criteri diagnostici per "emicrania cronica farmaco resistente", pazienti affetti da disturbi psichiatrici (in particolare psicosi o depressione maggiore), pazienti in terapia cronica con farmaci psicotropi, in particolare che agiscono sul sistema GABA-ergico. Per essere selezionati all'interno dello studio i pazienti con emicrania senz'aura non dovevano essere in terapia di profilassi con alcun farmaco nel momento della valutazione né esserlo stati nei 3 mesi precedenti.

Nella giornata in cui è stata eseguita la TMS è stato raccomandato di non assumere psicostimolanti (come per esempio teina, caffeina o nicotina).

I pazienti per i quali era posta diagnosi di emicrania cronica e quindi veniva data indicazione ad avviare terapia di profilassi con tossina botulinica, hanno eseguito il protocollo di studio prima dell'inizio del trattamento e dopo un anno dal suo inizio.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a stimolazione magnetica transcranica a singolo stimolo e a doppio stimolo a livello di entrambi gli emisferi.

Per valutare l'efficacia del trattamento si è utilizzata la scala di valutazione MIDAS; nel momento in cui i pazienti si sottoponevano al protocollo di studio veniva valutata anche l'eventuale presenza di cefalea in quel momento e la sua intensità tramite la scala numerica del dolore (Numeric Rating Scale, NRS con valori da 0 a 10)

Ogni soggetto è stato esaminato disteso su un lettino in una stanza silenziosa circa alla stessa ora della giornata.

Per la TMS è stato utilizzato un coil circolare posto sulla regione del cuoio capelluto corrispondente all'area motoria della mano contro laterale.

I MEP ottenuti con il singolo stimolo sono stati registrati con elettrodi si superficie dal muscolo primo interosseo dorsale. Gli stimoli magnetici sono stati somministrati ad un'intensità pari al 105% della soglia di eccitabilità corticale ottenuta durante il rilassamento muscolare.

I MEP ottenuti da stimolazione a doppio stimolo sono stati registrati dal muscolo primo interosseo dorsale in condizione di rilassamento muscolare. Dopo aver trovato la soglia di eccitabilità corticale Lo stimolo condizionato è stato somministrato ad un'intensità del 110% della soglia e la differenza d'intensità tra lo stimolo condizionante e lo stimolo condizionato è stata del 40 %. Sono state eseguite diverse serie di stimolazione a differenti intervalli interstimolo: 1 ms, 2 ms, 3 ms, 6 ms, 10 ms e 15 ms.

#### Parametri valutati

I parametri considerati in ogni seduta e poi confrontati sono:

- la soglia di eccitabilità corticale definita come l'intensità di stimolo minima alla quale si registra, in una sequenza di dieci stimoli, almeno nel 50 % dei casi un MEP con ampiezza superiore a 50  $\mu$ V;
- la latenza del MEP: tempo (ms) che intercorre tra lo stimolo e la comparsa del potenziale
- il periodo silente corticale (PSC): periodo di silenzio elettromiografico misurato dall'inizio del MEP alla ricomparsa dell'attività muscolare.
- Il tempo di conduzione motoria centrale (TCC): stima il tempo di transizione dell'impulso dalla corteccia ai motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale. Viene calcolato sottraendo la latenza periferica dal tempo di conduzione motoria totale. Per ottenere il tempo di conduzione periferica abbiamo utilizzato il metodo dell'onda F.
- per quanto riguarda la pp-TMS si è misurata *l'ampiezza dei MEP* picco-picco; quindi le ampiezze medie dei PEM sono state calcolate separatamente per ciascun'ISIs e si sono paragonate le differenze di ampiezza tra i PEM test e quelli condizionati.

### Analisi statistica

I dati saranno espressi come medie aritmetiche con deviazione standard (DS) o come percentuali.

Abbiamo utilizzato un t-test per dati appaiati per valutare:

- la variazione percentuale di ampiezza dei MEP ottenuti ai diversi intervalli di stimolo rispetto al valore basale separatamente all'interno di ciascun gruppo;

- la variazione di ampiezza dei MEP ottenuti ai diversi intervalli di stimolo rispetto al valore basale separatamente all'interno di ciascun gruppo.

Abbiamo utilizzato il t-test per dati non appaiati per confrontare i due gruppi di pazienti.

E' stato considerato significativo un valore di  $p \leq 0.05$ .

## RISULTATI

L'età media di pazienti affetti da emicrania cronica è di 36.18 anni.

I pazienti che hanno portato a termine lo studio sono stati 8 (1 paziente ha interrotto il trattamento con tossina botulinica, due pazienti non hanno accettato di ripetere il protocollo di studio).

L'età media dei soggetti affetti da emicrania senz'aura è di 31.3 anni; una paziente si è sottoposta solo alla TMS con singolo stimolo.

	Pz cronici		Pz cronici a 1 anno		Emicrania senz'aura	
	dx	sn	dx	sn	dx	sn
Soglia	45,5	46	42,14	44,57	54,16	56,6
PSC	80,81	68,04	58,64	65,60	110	83,66
TCMC	7,54	7,17	8,22	7,72	8,63	6,5

**Tab1 Dati ottenuti con la stimolazione a singolo stimolo per l'emisfero dx e l'emisfero sn**

Nei pazienti affetti da emicrania cronica farmacoresistente, i dati registrati con la TMS a doppio stimolo (pp-TMS) prima dell'inizio del trattamento con tossina botulinica, dimostrano una mancanza della fisiologica inibizione intracorticale per quando riguarda gli intervalli interstimolo tra 1-3 ms; avviene anche per questi intervalli una risposta di facilitazione in entrambi gli emisferi. La facilitazione è mantenuta anche per gli intervalli 6 ms , 10 ms e 15 ms, con una variazione d'ampiezza del potenziale motorio significativa per gli intervalli 10 ms e 15 ms a livello dell' emisfero dx e per tutti e 3 gli intervalli a sn (Tab 2; Graf. 1-2).

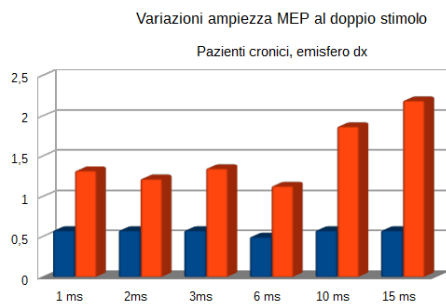
Pz cronici emisfero dx	1 ms	2ms	3ms	6ms	10ms	15ms
Amp SS (mV)±DS	0,58±0,39	0,58±0,39	0,58±0,39	0,5±0,39	0,58±0,39	0,58±0,39
Amp DS (mV) ±DS	1,32 ±1,42	1,22 ±1,74	1,35 ± 1,79	1,13 ±0,93	1,87±2,40	2,19±2,31
p	0,15	0,5	0,22	0,07	0,03	0,01
Pz cronici emisfero sn	1 ms	2ms	3ms	6ms	10ms	15ms
Amp SS (mV) ±DS	1,51 ±0,84	1,51 ±0,84	1,51 ± 0,84	1,51±0,84	1,51±0,84	1,51 ±0,84
Amp DS (mV)±DS	2,01±1,76	1,83± 1,38	2,3±2,41	2,29 ±1,8	2,64 ± ,95	3,06±2,32
p	0,28	0,21	0,2	0,05	0,04	0,02

**Tab 2 Valutazione iniziale pazienti cronici- Variazioni ampiezza MEP al doppio stimolo (DS)**

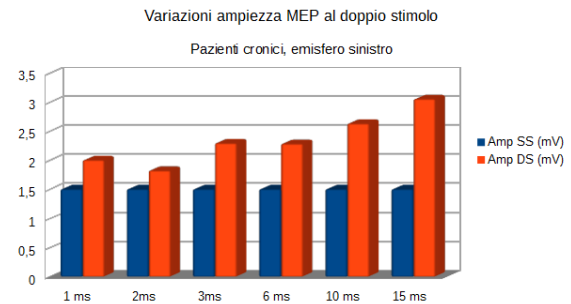
Rivalutando gli stessi pazienti a distanza di un anno, dopo aver quindi eseguito 4 trattamenti con tossina botulinica di tipo A, i parametri relativi all'eccitabilità corticale risultano sovrapponibili rispetto alla valutazione iniziale (tab1). Riguardo le risposte ottenute con la pp-TMS si osserva che per i bassi intervalli interstimolo ricompare l'inibizione intra-corticale solo per l'intervallo interstimolo di 2 ms a livello dell'emisfero dx ; viene mantenuta la facilitazione per tutti i restanti intervalli con variazioni significative per gli intervalli 6, 10 e 15 ms bilateralmente (Tab 3, Graf. 3-4).

Pz cronici dopo 1 aa emisfero dx	1 ms	2ms	3ms	6ms	10ms	15ms
Amp SS (mV) ± DS	0,99±0,36	0,99± 0,36	0,99± 0,36	0,99± 0,36	0,99±0,36	0,99±0,36
Amp DS (mV) ± DS	1,12±0,7	0,8±0,24	1,180±0,56	1,38±0,9	2,09±2,04	2,07±1,28
p	0,5	0,06	0,2	0,05	0,03	0,05
Pz cronici dopo 1 aa emisfero sn	1 ms	2ms	3ms	6ms	10ms	15ms
Amp SS (mV) ± DS	0,84±0,56	0,84±0,56	0,84±0,56	0,84±0,56	0,84±0,56	0,84±0,56
Amp DS (mV) ± DS	1,24±0,58	0,88 ±0,45	1,44± 0,76	1,32±0,59	1,46±0,76	1,61±0,9
p	0,07	0,07	0,06	0,04	0,05	0,04

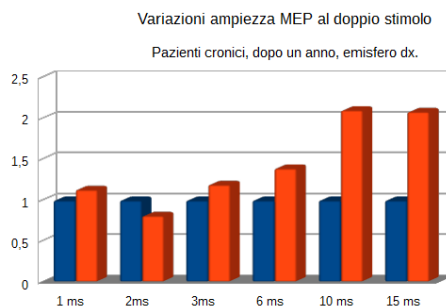
Tab 3. Valutazione pazienti cronici dopo un anno - Variazioni ampiezza MEP al doppio stimolo (DS)



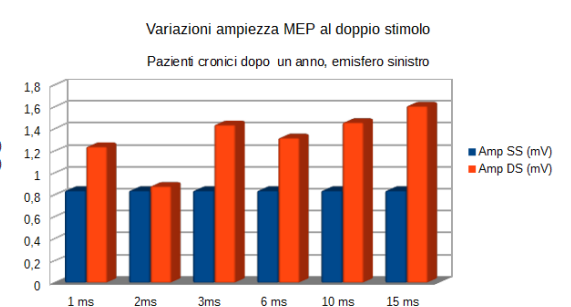
Graf. 1



Graf. 2



Graf. 3



Graf. 4

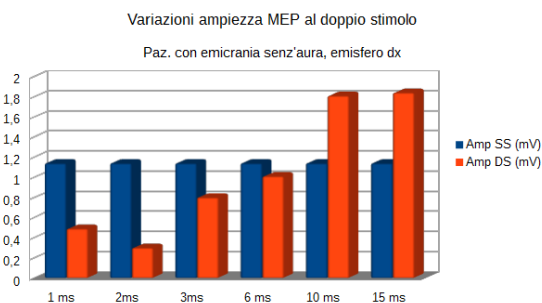
Per tutti i pazienti, la risposta clinica al trattamento è stata valida; il punteggio medio alla scala MIDAS è passato da 21,27 a 9.85 (p= 0,01)

I valori medi di NRS al momento della TMS sono 1 per quanto riguarda la prima valutazione (i pazienti che lamentavano cefalea erano 3, con valore massimo 5) e 0,8 per la seconda valutazione (due pazienti lamentavano cefalea, valore massimo 5).

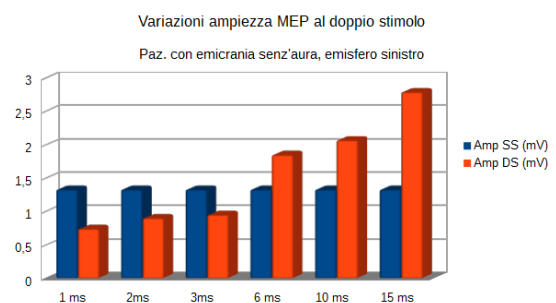
Nel gruppo dei pazienti affetti da emicrania senz'aura è presente, in entrambi gli emisferi, la fisiologica risposta per tutti gli intervalli interstimolo valutati (Tab 4, Graf. 6-7).

Pz emicrania senz'aura emisfero dx	1 ms	2ms	3ms	6ms	10ms	15ms
Amp SS (mV)± DS	1,14 ±0,48	1,14 ± 0,48	1,14 ± 0,48	1,14± 0,48	1,14± 0,48	1,14± 0,48
Amp DS (mV)± DS	0,49± 0,39	0,3± 0,25	0,8± 0,69	1,01 ± 0,9	1,81± 1,81	1,84± 1,18
p	0,009	0,01	0,06	0,5	0,2	0,05
Pz emicrania senz'aura emisfero sn	1 ms	2ms	3ms	6ms	10ms	15ms
Amp SS (mV)± DS	1,33± 0,72	1,33± 0,72	1,3± 0,72	1,33± 0,72	1,33± 0,72	1,33± 0,72
Amp DS (mV)± DS	0,74	0,9 ± 1,13	0,95± 0,92	1,85± 1,16	2,07± 1,4	2,79±1,21
p	0,05	0,4	0,4	0,2	0,05	0,06

Tab 4. Valutazione pazienti affetti da emicrania senz'aura - Variazioni ampiezza MEP al doppio stimolo (DS)



Graf.6



Graf. 7



Confrontando i dati dei pazienti affetti da emicrania cronica registrati all'inizio del trattamento con i dati dei pazienti affetti da emicrania senz'aura, emergono delle differenze per quanto riguarda i parametri registrati con il singolo stimolo; in particolare la variazione risulta essere significativa per quanto riguarda il valore soglia bilateralmente.(tab 5)

	Soglia dx+DS	TCMCdx (ms)+DS	PS dx( ms) +DS	Soglia sn+DS	TCMC sn (ms)+DS	PSC sn (ms) +DS
Cronici	45,9± 7,8	7,54±1,24	80,81±44,78	45,54± 8,1	7,16 ± 1,54	68± 33,5
Emicrania	54,16±3,76	8,63± 1,6	110± 24,9	56,66±5,16	6,51± 1,03	83,67± 29,5
p	0,03	0,14	0,05	0,04	0,6	0,3

**Tab 5. Confronto singolo stimolo tra i due gruppi di pazienti.**

## DISCUSSIONE

I recenti studi neurofisiologici effettuati su pazienti con dolore cronico hanno evidenziato come la plasticità sinaptica sia alla base della fisiopatologia di tale tipo di dolore, in quanto si verifica una modifica in senso mal adattativo alla risposta ad uno stimolo algogeno.

A causa di queste modificazioni i circuiti neuronali attivati dallo stimolo doloroso restano funzionanti anche quando lo stimolo non sussiste più, essendosi consolidata come una traccia nella memoria.

In particolare, per quanto riguarda il meccanismo di cronicizzazione dell'emicrania, il mantenimento di una sensibilizzazione del sistema trigemino-vascolare, fenomeno alla base della fase dolorosa dell'emicrania, sembra essere il meccanismo fisiopatologico alla base della cronicizzazione. Gli stessi eventi fisiopatologici che accadono durante un attacco emicranico determinano, in una stimolazione reiterata delle terminazioni nervose trigeminali, il mantenimento di una facilitazione della trasmissione nocicettiva al nucleo caudale del trigemino (Pierelli).

I dati che emergono dal nostro lavoro sono in linea con quanto appena affermato; infatti, i nostri pazienti al momento dell'arruolamento, quando cioè presentavano una cefalea che rispondeva ai criteri diagnostici di emicrania cronica, presentano una risposta alterata alla pp-TMS. Fisiologicamente, nei soggetti sani, uno stimolo condizionante somministrato sulla corteccia motoria ad una intensità inferiore all'intensità di soglia motoria non evoca di per sé alcun potenziale motorio, ma è in grado di sopprimere la risposta generata da un secondo stimolo se l'intervallo tra i due impulsi è breve (1-5) ms o, viceversa, di facilitare la risposta se l'intervallo è tra 6 e 50 ms.

Tali fenomeni sono chiamati rispettivamente inibizione intra-corticale a breve intervallo (SICI- Short Interval Intracortical Inhibition) e facilitazione intra-corticale (ICF-IntraCortical Facilitation) e riflettono l'influenza degli interneuroni all'interno della corteccia.

Infatti, per un ISI compreso fra 1 e 6 ms lo stimolo condizionante eccita circuiti inibitori gabaergici intracorticali che provocano una riduzione d'ampiezza del MEP evocato dallo stimolo test. Con ISI di 7-20 ms, con il soggetto a riposo,

lo stimolo condizionante eccita circuiti intracorticali più lenti, a significato facilitatorio, capaci d'aumentare l'ampiezza del MEP.

Analizzando i nostri dati, quello che emerge è una risposta in facilitazione per tutti gli intervalli interstimolo (ISI) considerati, in entrambi gli emisferi. Tuttavia l'aumento dell'ampiezza del MEP ottenuta con il doppio stimolo rispetto al singolo stimolo, risulta essere significativa per gli intervalli di 6,10 e 15 ms.

Inoltre, dopo aver eseguito la terapia di profilassi con tossina botulinica, i pazienti hanno presentato un significativo miglioramento del quadro clinico, ma a questo non è seguito un consensuale cambiamento dei dati neurofisiologici registrati. Infatti, la SICI è comparsa solo per l'intervallo di 2 ms ed esclusivamente a carico dell'emisfero dx, senza peraltro raggiungere la significatività. Per i restanti intervalli si è continuata a registrare una risposta in facilitazione.

Sottolineiamo come, sulla base degli studi a nostra disposizione (Verderio 2004; Aoki 2005), emerge che la tossina botulinica di tipo A possa, nell'emicrania cronica, modulare il dolore anche inibendo il rilascio di neurotrasmettitori tra cui il glutammato; quindi potrebbe bloccare proprio il circuito responsabile della facilitazione intracorticale che però nel nostro caso si mantiene predominante anche al termine della terapia.

Anche i dati riguardanti l'eccitabilità corticale (soglia motoria, TCMC, PSC) non hanno subito modificazioni in corso di terapia. In aggiunta a questo i valori di soglia risultano essere nettamente inferiori a quelli registrati nei pazienti affetti da emicrania senz'aura.

Ricordiamo brevemente il significato di tali parametri.

La soglia di attivazione riflette il grado di eccitabilità della via corticospinale, inclusi i neuroni piramidali, gli interneuroni corticali e i motoneuroni spinali.

Il tempo di conduzione centrale si calcola sottraendo il tempo dall'attivazione dei motoneuroni spinali alla risposta del muscolo (latenza periferica), dal tempo di attivazione dei motoneuroni alfa spinali (latenza centrale). Nel nostro studio abbiamo utilizzato la registrazione delle onde-F per valutare il tempo di conduzione dai motoneuroni spinali al muscolo

Il periodo silente si ottiene erogando uno stimolo soprasoglia durante una contrazione submassimale volontaria del muscolo target, il risultato è una transitoria inibizione dell'attività muscolare di durata proporzionale all'intensità di stimolo. Questo fenomeno indotto dalla TMS è prettamente corticale.

Considerando quindi il significato di tali parametri e i dati da noi registrati possiamo interpretare quanto ottenuto come un segno di maggiore reattività corticale nei pazienti con emicrania cronica. Tale condizione sembra essere una caratteristica intrinseca del paziente con emicrania cronica e non modificarsi in relazione alla terapia eseguita.

Infine, per evidenziare come le modifiche registrate siano legate alla cronicizzazione del dolore e non siano dovute ai meccanismi implicati nella genesi dell'emicrania (Jean Schoenen 2003), abbiamo sottoposto allo stesso protocollo di pp-TMS un piccolo gruppo di pazienti affetti da emicrania senz'aura, evidenziando come in questo caso siano presenti le risposte fisiologiche: SICI per l'intervallo 1-3 ms e ICF per gli intervalli 6,10 e 15 ms. (La significatività non è presente per tutti gli intervalli probabilmente a causa della scarsa numerosità del campione).

Confrontando inoltre i parametri basali è emersa una differenza significativa tra i due gruppi per quanto riguarda i valori di soglia d'attivazione: i pazienti con emicrania cronica presentano un valore di soglia inferiore rispetto ai pazienti con emicrania senz'aura. Tale dato è suggestivo di una maggior eccitabilità corticale nei pazienti con emicrania cronica.

## CONCLUSIONI

Dal nostro studio emerge che i pazienti affetti da emicrania cronica presentano un'alterata risposta alla stimolazione magnetica transcranica a doppio stimolo; in particolare non viene registrata la fisiologica risposta d'inibizione intra-corticale per bassi intervalli inter-stimolo. Questo dato suggerisce come tali pazienti presentino un cambiamento della plasticità corticale.

Il secondo elemento importante è che questo tipo di risposta alterata si mantenga anche dopo un adeguato trattamento di profilassi che ha portato ad un netto miglioramento clinico e alla scomparsa del dolore cronico.

Sottolineiamo come questi pazienti abbiano utilizzato come terapia di profilassi la tossina botulinica di tipo A per la quale è ormai chiaro che il meccanismo d'azione sul dolore cronico non sia dovuto solo ad un'azione periferica a livello della giunzione neuromuscolare, ma anche ad un'azione a livello centrale, probabilmente coinvolgendo anche i due circuiti responsabili della generazione della SICI e ICF (rispettivamente recettori GABA e sistema glutammatergico). Tutto questo non sembra, però, aver influito sulle risposte neurofisiologiche registrate poiché non abbiamo osservato un cambiamento globale e significativo dei dati registrati prima e dopo il trattamento.

Possiamo quindi pensare che i meccanismi di mal adattamento cerebrale, che s'innescano nel momento in cui un dolore diventa cronico, portino a dei cambiamenti di plasticità che perdurano anche quando la cronicità del dolore è interrotta.

Da punto di vista terapeutico, negli ultimi anni la ricerca si è concentrata sulla possibilità di adoperare tecniche di neuromodulazione cerebrale per curare patologie dolorose croniche, tra cui anche l'emicrania cronica.

La TMS si è in grado di ridurre o potenziare l'attività di specifiche aree corticali, quindi è possibile correggere i meccanismi alla base di quelle patologie per le quali sono state dimostrate un'eccessiva o una ridotta attività corticale. Infatti, la TMS può interferire con l'attività neurale in corso permettendo, da un lato, lo studio dei tempi dell'attivazione neurale alla base di funzioni motorie e cognitive e dall'altro la possibilità di interrompere attività potenzialmente patologiche.

Nell'ambito dell'emicrania esistono due diversi possibili approcci: la TMS a singoli impulsi per interferire con i meccanismi corticali alla base dell'attacco nell'emicrania con aura e protocolli con stimolazioni ripetute con r-TMS per il trattamento dell'emicrania cronica.

Studi multicentrici e su ampie casistiche hanno dimostrato che la TMS a singolo impulso erogata sull'area occipitale all'inizio dell'aura è in grado di interrompere sia il disturbo visivo sia la cefalea che segue. Attualmente sia in USA che e nel Regno Unito tale procedura è stata approvata per il trattamento dell'emicrania con aura .

E' ragionevole inoltre ipotizzare che l'utilizzo della r-TMS possa avere un ruolo importante nella terapia dell'emicrania cronica perché alla base di tale fenomeno esistono dei cambiamenti non solo di eccitabilità, ma anche di plasticità corticale; però, al momento, non è noto se e in quanto tempo tali alterazioni vengono rimodulate e inoltre, nonostante esistano evidenze che l'area principalmente coinvolta sia la corteccia frontale premotoria dorso-laterale, è verosimile che anche circuiti più profondi che coinvolgono il nucleo del rafe e i nuclei mesencefalici possano essere responsabili dell'innescare di tali meccanismi.

Dal nostro lavoro emerge che anche dopo 12 mesi di terapia farmacologica efficace le fisiologiche risposte d'inibizione corticale che si registrano con la TMS a doppio stimolo non sono ricomparse; ribadiamo quindi l'idea che i cambiamenti che coinvolgono i meccanismi di plasticità cerebrale sono sensibilmente implicati nei processi di sviluppo del dolore di tipo cronico.

## Bibliografia

- Andrew Blumenfeld; Stephen D. Silberstein; David W. Dodick; Sheena K. Aurora; Catherine C. Turkel; William J. Binder. Method of Injection of OnabotulinumtoxinA for Chronic Migraine: A Safe, Well-Tolerated, and Effective Treatment Paradigm Based on the PREEMPT Clinical Program. *Headache* 2010;50:1406-1418.
- A Starr, M. Caramia, F. Zarola, PM. Rossini. Enhancement of motor cortical excitability in humans by non-invasive electrical stimulation appears prior to voluntary movement. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiol* 1988; 70: 26±32.
- Aoki KR - Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology* 2005; 26:785-793.
- AK. Datta , LM. Harrison and JA. Stephens. Task-dependent changes in the size of response to magnetic brain stimulation in human first dorsal interosseus muscle. *Jof Physiology* 1989; 418: 13-23.
- A.V. Apkarian, J.A. Hashmi, and M.N. Baliki, S. Rossi, M. Hallett, P.M. Pain and the brain: Specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain*. 2011 ; 152(3): S49- S64.
- C Tomberg, M. Caramia. Prime mover muscle in finger lift or finger flexion reaction times: identification with transcranial magnetic stimulation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiol* 1991; 81:319- 322.
- C Verderio, D. Pozzi, E. Pravettoni, F. Inverardi, U. Schenk, S. Coco, V. Proux Gillardeaux, T. Galli, O. Rossetto, C. Frassoni, M. Matteoli. SNAP-25 Modulation of calcium dynamics underlies differences in GABAergic and glutamatergic responsiveness to depolarization. *Neuron* 2004; 41: 599–610.
- EA. Moulton, L. Becerra, N. Maleki, G. Pendse, S. Tully, R. Hargreaves, R. Burstein and D. Borsook. Painful Heat Reveals Hyperexcitability of the Temporal Pole in Interictal and Ictal Migraine States. *Cerebral Cortex* February 2011; 21: 435- 448.
- Francesco Pierelli, Elisa Iacovelli, Martina Bracaglia, Mariano Serrao, Gianluca Coppola. Abnormal sensorimotor plasticity in migraine without aura patients. *PAIN* 2013; 154: 1738- 1742.
- F. Ganella, MP. Prudenzano, P. Sarcinelli. Linee guida per la diagnosi e la terapia delle cefalee primarie. 2001
- G. Baltazar, A. Tomé, AP. Carvalho, EP. Duarte. Differential contribution of syntaxin 1 and SNAP-25 to secretion in noradrenergic and adrenergic chromaffin cells. *Eur J Cell Biol.* 2000 Dec;79 (12):883-91.

G. Zanette, C. Bonato, A. Polo, M. Tinazzi, P. Manganotti P, A. Fiaschi. Longlasting depression of motor evoked potentials to transcranial magnetic stimulation following exercise. *Exp Brain Res* 1995; 107: 80- 86.

H. Gobel, A. Heinze, K. Heinze-Kuhn, K Austermann. Botulinum toxin A in the treatment of headache syndromes and pericranial pain syndromes. *Pain* 2001; 91: 195–199.

Irene Tracey, and Patrick W. Mantyh. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron* 2007; 55: 377-391.

J. Ruohonena, J. Karhua. Navigated transcranial magnetic stimulation. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 2010; 40(1): 7-17.

Jean-Pascal Lefaucheur, Andrea Antal, Rechdi Daniel Ciampi de Andrade, Felipe Fregni, Eman M. Khedr, Michael Nitsche, Walter Paulus. The use of repetitive Transcranial magnetic stimulation (r- TMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS) to relieve pain. *Brain Stimulation* 2008; 1: 337–44

Jean Schoenen, Anna Ambrosini, Peter S Sándor, Alain Maertens de Noordhout. Evoked potentials and transcranial magnetic stimulation in migraine: published data and viewpoint on their pathophysiologic significance. *Clinical Neurophysiology*, June 2003; 114(6): 955–972

Jerome N. Sanes and John P. Donoghue. Plasticity and Primary Motor Cortex. *Annual Review of Neuroscience* 2000; 23: 393-415.

Yew-Long Lo and Stephanie Fook-Chong. The Silent Period Threshold as a Measure of Corticospinal Inhibition. *J Clin Neurophysiol* 2005; 22: 176- 179.

Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013; 33(9): 629- 808.

HC Diener, DW Dodick, SK Aurora, CC Turkel, RE DeGryse<sup>4</sup>, RB Lipton<sup>5</sup>, SD Silberstein and MF Brin, on behalf of the PREEMPT 2 Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: Results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 2 trial. *Cephalalgia* 2010; 30(7): 804- 814.

M. Tinazzi, G. Zanette. Modulation of ipsilateral motor cortex in man during bimanual finger movements of different complexities. *Neurosci Lett* 1998; 244: 121- 124.

M. Hallett and S. Chokroverty. *Magnetic Stimulation in Clinical Neurophysiology*. Elsevier second edition, 2005

Paola Sarchielli, Franco Granella, Maria Pia Prudenzano, Luigi Alberto Pini, Vincenzo Guidetti, Giorgio Bono, Lorenzo Pinessi, Massimo Alessandri, Fabio Antonaci, Marcello Fanciullacci, Anna Ferrari, Mario Guazzelli, Giuseppe



Nappi, Grazia Sances, Giorgio Sandrini, Lidia Savi, Cristina Tassorelli, Giorgio Zanchin Italian guidelines for primary headaches: 2012 revised version. *J Headache Pain* 2012; 13 (2): S31- S70.

Paul L. Durham and Roger Cady. Insights Into the Mechanism of OnabotulinumtoxinA in Chronic Migraine. *Headache*. 2011 ; 51(10): 1573- 1577.

P. Sacco, GW. Thickbroom, ML. Thompson, FL. Mastaglia. Changes in corticomotor excitation and inhibition during prolonged submaximal muscle contractions. *Muscle Nerve* 1997; 20: 1158-1166.

PJ Maccabee, VE Amassian, LP Eberle,RQ Cracco. Magnetic coil stimulator of straight and bent amphibian and mammalian peripheral nerve in vitro: locus of excitation. *The journal of physiology*, 1993; 460(1) 201-219.

R.Chen,D Cros, A.Curra,V.Di Lazzaro, JPLefaucheur, MR Magistris, K Millis, KM. Rosler, WJ Triggs, Y. Ugawa, U. Ziemann. The clinical diagnostic utility of transcranialmagnetic stimulation: report of an IFCN committee. *Clinical Neurophysiology*,208;119(3): 504-532.

R Jalinous. Technical and Practical Aspects of Magnetic Nerve Stimulation. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 1991; 8(1): 10-25.

RB. Lipton . Tracing transformation chronic migraine: classification,progression and epidemiology. *Neurology*, 2009; 72 (1): S3-S7.

S. Boniface and U. Ziemann. *Plasticity in the Human Nervous System: Investigations with Transcranial Stimulation*. Cambridge, 2009.

S. Groppa, N.Werner-Pewtrol, A.Munchau, G. Deuschl. A novel dual-site transcranial magnetic stimulation paradigm to probe fast facilitatory inputs from ipsilateral dorsal premotor cortex to primary motor cortex. *Neuroimge* 2012; 62(1): 500-509.

S. Rossi, M. Hallett, P.M. Rossini, A. Pascual-Leone and The Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clinical Neurophysiology* 2009; 120 (12): 2008-2039.

T. Murakami, M. Okada, Y. Kawata, G. Zhu, A. Kamata, S. Kaneko. Determination of effects of antiepileptic drugs on SNAREs-mediated hippocampal monoamine release using in vivo microdialysis. *Br J Pharmacol* 2001; 134(3):507-20.

Tihomir V. Ilić, Frank Meintzschel, Ulrich Cleff, Diane Ruge, Kirn R. Kessler and Ulf Ziemann. Short-interval paired-pulse inhibition and facilitation of human motor cortex: the dimension of stimulus intensity. *Journal of Physiology* 2002; 545(1): 153–167.

V. Di Lazzaro, D. Restuccia, A. Oliviero, P. Profice, L. Ferrara, A. Insola, P. Mazzone , P. Tonali and J. C. Rothwell. Effects of voluntary contraction on

descending volleys evoked by transcranial stimulation in conscious humans. *Journal of Physiology* 1998; 508(2): 625—633.

V. Di Lazzaro, A. Oliviero, F. Pilato, E. Saturno, M. Dileone, P. Mazzone, A. Insolad, P.A. Tonali, J.C. Rothwell. The physiological basis of transcranial motor cortex stimulation in conscious humans. *Clinical Neurophysiology* 2004; 115: 255–266.

W. Muellbacher, S. Facchini, B. Boroojerdi, M. Hallett . Changes in motor cortex excitability during ipsilateral hand muscle activation in humans. *Clinical Neurophysiology* 2000; 111: 344- 349.

Waller McCombe, Larry Forrester, Federico Villagra, Jill Whitall. Intracortical inhibition and facilitation with unilateral dominant, unilateral nondominant and bilateral movement tasks in left- and right-handed adults. *Journal of the Neurological Sciences* 2008; 269(1): 96-104.