

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS DOCTORAL

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN LA MIGRAÑA CRÓNICA:

ANÁLISIS DE METILACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA MIGRAÑA EN LOS GWAS Y GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES.

Realizada por: Sara Pérez Pereda

Dirigida por: Agustín Oterino Durán y María Toriello Suárez

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2022

Agradecimientos

A mis padres, por inculcarme el valor de la constancia y el trabajo, y por estar siempre y para todo.

A Diego, por ver todo lo que yo no veo, por su serenidad y su optimismo.

A María y a Vicente, por su incansable ayuda, sin la cual esta tesis no hubiera salido adelante.

A Agustín, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por su apoyo durante todo este tiempo.

A Julio, por transmitirme el entusiasmo por la Neurología desde mis tiempos en la Facultad de Medicina de Oviedo, y por su gran apoyo en la recta final.

A Fernando y a Olga, por su asesoramiento en la parte más psíquica de este trabajo.

A Manuel, por su generosidad y su arte al ilustrar esta tesis.

Al servicio de Neurología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, donde he crecido a nivel personal y profesional.

“No hay prisa. No hay necesidad de brillar.
No es necesario ser nadie salvo uno mismo.”

Una habitación propia. Virginia Woolf.

“Nuestros padres nos legaron una valiosa brújula biológica
que nos orienta tras nuestro aterrizaje en el planeta de los genes,
pero ellos no son los responsables de la modelación en nuestros cuerpos
de otros grandes lenguajes de la vida, el epigenoma y el metagenoma,
que nosotros mismos vamos esculpiendo a nuestra manera,
<<golpe a golpe, verso a verso>>,
a través del diálogo cotidiano con el ambiente que nos rodea”.

La vida en cuatro letras. Carlos López-Otín.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1 CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA MIGRAÑA.....	25
Migraña crónica.....	28
1.2 GENÉTICA DE LA MIGRAÑA.....	30
Etapa pre-GWAS.....	30
Etapa GWAS	33
1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA.....	39
Pródromos.....	40
Aura.....	41
Dolor	43
1.4 BIOMARCADORES.....	46
Biomarcadores de imagen	46
Biomarcadores bioquímicos.....	47
CGRP	47
VIP	48
PACAP	48
Otros péptidos	49
1.5 COMORBILIDADES Y PERSONALIDAD.....	50
1.6 MECANISMOS DE CRONIFICACIÓN DE LA MIGRAÑA.....	52
Estrés y migraña	53
Trastorno por estrés postraumático.....	54
1.7 EPIGENÉTICA.....	56
Generalidades	56
Metilación del ADN y otros mecanismos epigenéticos	57
Importancia de la epigenética y estudios de metilación del ADN en migraña	60
2. HIPÓTESIS.....	69
2.1 FUNDAMENTOS.....	71
2.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	72
3. OBJETIVOS.....	73
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	75
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	75

4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	79
4.2 PACIENTES.....	79
4.3 MUESTRAS.....	81
4.4 GENES CANDIDATOS E ISLAS CpG.....	82
Bases para la selección de los genes	82
Genes asociados a la migraña en los GWAS	82
Genes relacionados con la cronificación de la cefalea (EWAS)	84
Genes relacionados con la respuesta al estrés.....	85
Islas CpG.....	87
4.5 PROCEDIMIENTO.....	89
Etapla clínica: análisis de características clínicas y perfiles psicológicos.....	89
Etapla experimental.....	94
Determinación de CGRP, VIP y PACAP.....	94
Análisis de la metilación del ADN	95
Análisis de la expresión de ARNm	98
Análisis estadístico.....	100
5. RESULTADOS	103
5.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	105
5.2 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE CGRP, VIP Y PACAP.....	110
5.3 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN.....	112
Genes asociados a la migraña en los GWAS.....	112
Cefalea por abuso de medicación.....	118
Tratamiento preventivo	119
Genes relacionados con la respuesta al estrés	121
Genes relacionados con la cronificación de la cefalea.....	123
5.4 ANÁLISIS DEL ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y LOS EVENTOS VITALES TRAUMÁTICOS.....	126
Frecuencia del TEPT y los ET.....	127
Migraña refractaria.....	129
Impacto del TEPT sobre marcadores clínicos, bioquímicos y otras comorbilidades de la migraña	129
6. DISCUSIÓN	135
6.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y COMORBILIDADES DE LA MUESTRA.....	137

6.2 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN	138
Genes asociados a la migraña en los GWAS.....	139
MTDH/AEG1 (Metadherina o Gen 1 elevado en astrocitos).....	139
<i>MTDH/AEG1</i> y homeostasis del glutamato en la migraña....	140
<i>MTDH/AEG1</i> , cefalea por abuso de medicación y marcadores de gravedad de la migraña.	143
<i>MTDH/AEG1</i> y tratamientos preventivos	144
<i>MTDH/AEG1</i> como biomarcador de la migraña crónica.....	145
TGFβ1 (Factor de crecimiento transformante β1).....	145
ZNF555 (Proteína de los dedos de zinc 555)	147
Otros genes de los GWAS.....	148
Genes relacionados con la respuesta al estrés	148
NTSR1 (Receptor de la neurotensina tipo 1)	148
Otros genes relacionados con el estrés. NR3C1 y CRF.....	151
Genes relacionados con la cronificación de la cefalea.....	153
Puntos fuertes y limitaciones	155
6.3 ANÁLISIS DEL TRASTORNO POR ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y LOS EVENTOS VITALES TRAUMÁTICOS	157
Frecuencia del TEPT y los ETs.....	157
Impacto del TEPT en los pacientes con migraña.....	159
Puntos fuertes y limitaciones	161
7. CONCLUSIONES	163
8. BIBLIOGRAFÍA.....	167
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	185
9.1 COMITÉ DE ÉTICA	187
9.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO	188
9.3 ESCALAS Y CUESTIONARIOS	193
9.4 ARTÍCULOS	207

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Criterios diagnósticos de la migraña sin aura (CIC-3 β).

Tabla 2.- Criterios diagnósticos de la migraña con aura típica (CIC-3 β).

Tabla 3.- Criterios diagnósticos de la migraña crónica (CIC-3 β).

Tabla 4.- Principales factores genéticos de riesgo identificados en los GWAS de migraña.

Tabla 5.- Factores de riesgo para la migraña crónica.

Tabla 6.- Estudios de metilación del ADN en migraña.

Tabla 7.- Criterios diagnósticos de la cefalea por abuso de medicación (CIC-3 β).

Tabla 8.- Fundamentos para la selección de los genes asociados a la migraña en los GWAS.

Tabla 9.- Fundamentos para la selección de los genes asociados a la cronificación de la cefalea.

Tabla 10.- Fundamentos para la selección de los genes implicados en la respuesta al estrés.

Tabla 11.- Genes candidatos e islas CpG estudiadas.

Tabla 12.- Características clínicas y demográficas de la muestra.

Tabla 13.- Comparación de las concentraciones séricas de CGRP, VIP y PACAP entre las diferentes categorías clínicas.

Tabla 14.- Comparación entre los niveles de metilación de los genes asociados a la migraña en los GWAS en los diferentes grupos clínicos.

Tabla 15.- Modelos de regresión logística para analizar el riesgo de MC o ME según el nivel de metilación de los genes asociados a la migraña en los GWAS.

Tabla 16.- Riesgo de MC con CAM según el nivel de metilación de *MTDH/AEG1*.

Tabla 17.- Comparación entre los niveles de metilación de los genes relacionados con la respuesta al estrés en los diferentes grupos clínicos.

Tabla 18.- Modelo de regresión logística multinomial para analizar el riesgo de MC o ME vs CS según el nivel de metilación de los genes implicados en la respuesta al estrés.

Tabla 19.- Modelo de regresión logística multinomial para analizar el riesgo de MC vs ME según el nivel de metilación de los genes implicados en la respuesta al estrés.

Tabla 20.- Nivel de metilación de *SH2D5* y *NPTX2* en los diferentes grupos clínicos.

Tabla 21.- Coeficientes de regresión, *odds ratio* e IC al 95%, correspondientes al modelo de regresión logística multinomial para el análisis del riesgo de MC o ME según el nivel de metilación de *SH2D5* y *NPTX2* y la edad.

Tabla 22.- Características demográficas, clínicas y comorbilidades de la submuestra de pacientes que respondieron a los cuestionarios de evaluación psicológica.

Tabla 23.- Frecuencia del TEPT y los ETs en MC y ME.

Tabla 24.- Diferencias clínicas, comorbilidades y niveles basales de neuropéptidos entre los pacientes con y sin TEPT.

Tabla 25.- Tipo y número de ETs referidos y diferencias según el grupo clínico (MC/ME y MR/no MR).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Sistema trigémino-vascular y estructuras implicadas en la génesis del ataque de migraña.

Figura 2.- Relación entre el estrés, la migraña y otras comorbilidades.

Figura 3.- Esquema de la metilación del ADN.

Figura 4.- Esquema del proceso de amplificación de la PCR.

Figura 5.- Ejemplo de la curva de expresión como resultado de la PCR.

Figura 6.- Distribución por sexos de la muestra.

Figura 7.- Distribución de los principales diagnósticos (A. MC, ME y CS; B. MR; C.MC con CAM).

Figura 8.- Flujograma de pacientes.

Figura 9.- Diagramas de cajas que muestran los niveles séricos basales de CGRP, VIP y PACAP en las diferentes categorías clínicas.

Figura 10.- Diagrama de cajas que muestra el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* en los diferentes grupos clínicos.

Figura 11.- Nubes de puntos que muestran la correlación entre el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* y la puntuación en la escala MIDAS (A), el número de días de cefalea/90 días (B) y la edad (C).

Figura 12.- Diagrama de cajas que muestra el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* en los pacientes con MC según CAM o no.

Figura 13.- Curva ROC para el diagnóstico de MC vs ME y CS según el PMR de *MTDH/AEG1*.

Figura 14.- Nubes de puntos que muestran la correlación entre el nivel de metilación de la región 5' aguas arriba de *SH2D5* (A) y el exón 1 de *NPTX2* (B) con la edad.

Figura 15.- Distribución del TEPT entre los pacientes con MC y ME.

Figura 16.- Diferencia en las puntuaciones en las escalas de depresión, ansiedad y fatiga entre migrañosos con y sin TEPT.

Figura 17.- Diferencia en las puntuaciones en las escalas de calidad de vida entre migrañosos con TEPT y sin TEPT.

Figura 18.- Diferencia en la puntuación de síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea entre migrañosos con TEPT y sin TEPT.

Figura 19.- Esquema que refleja las consecuencias de la regulación al alza del gen *MTDH/AEG1* sobre la homeostasis del glutamato y los mecanismos de la migraña en el SNC.

Figura 20.- Esquema del papel del NTR1 en el sistema regulador descendente del dolor.

ABREVIATURAS

ADAR β 2 (del inglés, Adenosine Deaminase RNA specific β 2): Adenosina desaminasa ARN específico β 2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ADNMT: ADN metiltransferasas

AMPP (del inglés, American Migraine Prevalence and Prevention Study): Estudio americano de prevalencia y prevención de la migraña

ASTN2 (del inglés, Astrotactin 2): Astrotactina 2

BAI (del inglés, Beck Anxiety Inventory): Inventario de Ansiedad de Beck

BDI (del inglés, Beck Depression Inventory): Inventario de Depresión de Beck

BDNF (del inglés, Brain derived neurotrophic factor): Factor neurotrófico derivado del cerebro

C: Citosina

CADASIL: Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos cerebrales y leucoencefalopatía

CGRP (del inglés, Calcitonin Gen Related Peptide): Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

C_r (del inglés, Threshold Cycle): Ciclo umbral

IC: Intervalo de confianza

CIC: Clasificación Internacional de las Cefaleas

COMT: Catecol-o-metiltransferasa

CpG: Dinucleótido citosina-fosfato-guanina

CRF (del inglés, Corticotropin releasing factor): Factor liberador de corticotropina.

CS: Controles sanos

CTT: Cefalea tensional

DCP: Depresión cortical propagada

DSM (del inglés, Diagnostic and statistical manual of mental disorders): Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

EAAT (del inglés, Excitatory amino acid transporter): Transportador de aminoácidos excitadores

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA (del inglés, Enzyme-linked immunosorbent assay): Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ESR1 (del inglés, Estrogen Receptor 1): Receptor de estrógenos tipo 1

ET: Evento traumático

EWAS (del inglés, Epigenome-wide association study): Estudio del epigenoma completo

G: Guanina

GRIN2 β (del inglés, Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2 β): Subunidad 2 β del receptor ionotrópico NMDA del glutamato

GWAS (del inglés, Genome-wide association study): Estudio del genoma completo

HHA: Eje hipotálamo-hipofiso-adrenal

HIT-6 (del inglés, Headache impact test-6): Test de impacto de la cefalea

HTA: Hipertensión arterial

HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

IHS (del inglés, International Headache Society): Sociedad Internacional de las Cefaleas

IMC: Índice de masa corporal

KCNK18 (del inglés, Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 18): Miembro 18 de la subfamilia K del canal de potasio

LC: Locus coeruleus

LRP1 (del inglés, Low density lipoprotein receptor-related protein 1): Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad

MC: Migraña crónica

MCA: Migraña con aura

ME: Migraña episódica

MEF2D (del inglés, Myocyte enhancer factor 2D): Factor potenciador de miocitos 2D

MHF: Migraña hemipléjica familiar

MIDAS (del inglés, Migraine disability assessment scale): Escala de discapacidad de la migraña

MR: Migraña refractaria

MRVM: Médula rostral ventromedial

MSA: Migraña sin aura

MTDH/AEG1 (del inglés, Methaderine/ Astrocyte elevated gene-1): Metadherina o Gen-1 elevado astrocitario

MTHFR: Metilentetrahidrofolato reductasa

NCT: Núcleo caudal del trigémino

NGFR (del inglés, Nerve growth factor receptor): Receptor del factor de crecimiento nervioso

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPTX2 (del inglés, Neuronal pentraxine 2 protein): Proteína pentraxina neuronal 2

NRST1 (del inglés, Neurotensin receptor 1): Receptor 1 de la neurotensina

NR3C1 (del inglés, Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 or glucocorticoid receptor): Receptor de glucocorticoides

OMS: Organización mundial de la salud

OnaBT: Toxina Botulínica tipo A

OR (del inglés, Odds ratio): Razón de probabilidades

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PACAP (del inglés, Pituitary adenylate cyclase activating peptide): Péptido activador de la adenilatociclasa pituitaria

PET (del inglés, Positron Emission Tomography): Tomografía por emisión de positrones

PGCP (del inglés, Plasma glutamate carboxypeptidase): Glutamato carboxipeptidasa plasmática

PHACTR1 (del inglés, Phosphatase And Actin Regulator 1): Regulador de fosfataza y actina 1

PMR: Porcentaje de metilación de una referencia

POMC: Proopiomelanocortina

PRDM16 (del inglés, Transcription factor PR domain containing 16): Dominio PR del factor de transcripción que contiene 16

RAMP1 (del inglés, Receptor Activity Modifying Protein 1): Proteína modificadora de la actividad del receptor 1

RM: Resonancia magnética

RS (del inglés, Reference SNP): SNP de referencia

SGP: Sustancia gris periacueductal

SH2D5 (del inglés, SH2 domain containing protein 5): Dominio SH2 que contiene la proteína 5

SLC6A4 (del inglés, Solute Carrier Family 6 Member 4): Transportador de solutos de la familia 6 miembro 4

SCL6A5 (del inglés, Solute Carrier Family 6 Member 5): Transportador de solutos de la familia 6 miembro 5

SNP (del inglés, Single Nucleotide polymorphism): Polimorfismo de nucleótido simple

STV: Sistema trigémino-vascular

TBP (del inglés, TATA-box binding protein): Proteína de unión a caja TATA

TEPT: Trastorno por estrés postraumático

TGFβ1 (del inglés, Transforming growth factor β1): Factor de crecimiento transformante β1

TGFβR2 (del inglés, Transforming growth factor receptor β2): Receptor del factor de crecimiento transformante β2

TRPM8 (del inglés, Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8): Receptor transitorio Potencial de canal de cationes Subfamilia M Miembro 8

TRPV1 (del inglés, Transient receptor potential cation channel): Receptor de potencial transitorio V1

TQ: Cuestionario para experiencias traumáticas

VIP (del inglés, Vasoactive Intestinal Peptide): Péptido intestinal vasoactivo

RVCL: Vasculopatía retiniana con leucodistrofia cerebral

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN LA MIGRAÑA CRÓNICA: ANÁLISIS DE METILACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA MIGRAÑA EN LOS GWAS Y GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES.

Resumen.

Justificación. La migraña es una enfermedad frecuente de origen multifactorial cuyo componente genético es poligénico. Los factores genéticos que confieren susceptibilidad a la forma más discapacitante de la enfermedad, la migraña crónica (MC), así como los mecanismos biológicos subyacentes, son desconocidos. La epigenética es un campo en auge en el estudio de las enfermedades multifactoriales, que permite vincular las influencias ambientales con cambios en la expresión génica no codificados en la secuencia de ADN, que dan lugar a un fenotipo y son también heredables. Se conocen múltiples factores de riesgo para la cronificación de la migraña y algunas evidencias de la importancia de los mecanismos epigenéticos, pero los estudios dirigidos a investigar biomarcadores epigenéticos de la enfermedad son todavía escasos.

Objetivos. El objetivo principal de este trabajo fue investigar la existencia de modificaciones epigenéticas en determinados genes candidatos en sujetos con migraña, y su relación con el riesgo de sufrir MC. Otros objetivos fueron investigar la relación entre las modificaciones epigenéticas encontradas y variables clínicas y biomarcadores bioquímicos de la migraña, así como analizar la frecuencia de eventos traumáticos (ETs) y trastorno por estrés postraumático (TEPT) en migrañosos y su impacto sobre la migraña.

Material y métodos. Se realizó un estudio de corte transversal de casos y controles en el que se incluyeron 109 MC, 98 migrañosos episódicos (ME) y 98 controles sanos (CS) emparejados por edad y sexo. Se analizaron las concentraciones séricas interictales de CGRP, VIP y PACAP mediante ELISA y el nivel de metilación de los genes candidatos mediante una PCR cuantitativa específica para metilación. Se

realizó una valoración clínica, de comorbilidades, y se investigaron los ETs y el TEPT mediante cuestionarios validados.

Resultados. La muestra final para los análisis de laboratorio estuvo compuesta por 101 MC, 98 ME y 97 CS, con una media de edad de 41 ± 10 años; 89,9% mujeres. Se encontró que la metilación del exón 1 de *MTDH/AEG1* se asocia con MC y cefalea por abuso de medicación y se correlaciona con la puntuación MIDAS, días de cefalea/90 días y los niveles de VIP y de PACAP. También encontramos que la menor metilación del extremo 5' de *NTSR1* incrementa el riesgo de MC vs ME. 116 pacientes (85 MC y 31 ME) se sometieron a los cuestionarios de evaluación neuropsicológica. La frecuencia del TEPT fue superior en migrañosos que la descrita en la población general, y se asoció con más comorbilidades y peor calidad de vida. La frecuencia de ETs no difiere entre los pacientes con MC y ME, pero encontramos una elevada frecuencia de violencia sexual entre los pacientes que cumplen criterios de migraña refractaria (MR).

Conclusiones. Concluimos que existen diferencias en la metilación de algunos genes asociados a la migraña en los GWAS e implicados en la respuesta al estrés entre pacientes con MC y ME, que podrían constituir mecanismos adaptativos al dolor y estrés crónicos. El TEPT es una comorbilidad frecuente con la migraña, que impacta de forma negativa en su pronóstico, sugiriendo su importancia como factor de cronificación, y la necesidad de investigarlo y abordarlo en la consulta de cefaleas, especialmente en aquellos con MC y MR.

EPIGENETIC MODIFICATIONS IN CHRONIC MIGRAINE: METHYLATION ANALYSIS OF GWAS-ASSOCIATED MIGRAINE GENES AND GENES INVOLVED IN THE RESPONSE TO STRESS IN A CASE-CONTROL STUDY.

Abstract

Background. Migraine is a common multifactorial disease whose genetic component is polygenic. The genetic factors that confer susceptibility to the most disabling form of the disease, chronic migraine (CM), as well as the underlying biological mechanisms, are unknown. Epigenetics is a growing field in the study of multifactorial diseases, which makes it possible to link environmental influences with changes in gene expression not encoded in the DNA sequence, which give rise to a phenotype and are also heritable. There are multiple known risk factors for the chronification of migraine and some evidence of the importance of epigenetic mechanisms, but studies aimed at investigating epigenetic biomarkers of the disease are still scarce.

Objective. The main objective of this work was to investigate the existence of epigenetic modifications in certain candidate genes in subjects with migraine, and its association with the risk of CM. Other objectives were to investigate the relationship of the epigenetic modifications found and clinical variables and biochemical migraine biomarkers, as well as to analyse the frequency of traumatic events (TEs) and post-traumatic stress disorder (PTSD) in migraineurs and their impact on migraine.

Material and methods. A cross-sectional case-control study was carried out in which 109 CM, 98 episodic migraineurs (EM) and 98 healthy controls (HC) were included, matched by age and sex. Interictal serum concentrations of CGRP, VIP and PACAP were analysed by ELISA and the methylation level of candidate genes were determined by a methylation-specific quantitative PCR. Clinical assessment, comorbidities and TEs and PTSD were investigated using validated questionnaires.

Results. The final sample for laboratory analysis consisted of 101 MC, 98 ME and 97 CS, with a mean age 41 ± 10 y.o; 89.9% women. Methylation of exon 1 of *MTDH/AEG1* was found to be associated with CM and medication overuse headache and correlated with MIDAS score, headache days/90 days and VIP and PACAP levels. We also found that the lower methylation of the 5' upstream of *NTSR1* increased the risk of CM vs EM. 116 patients (85 MC y 31 ME) underwent neuropsychological evaluation questionnaires. PTSD frequency was higher in migraineurs than that described in the general population, and was associated with more comorbidities and poorer quality of life. The frequency of TEs does not differ between CM and EM, but a high frequency of sexual violence among patients who met criteria for refractory migraine (RM) was found.

Conclusions. We conclude that there are differences in the methylation level of some of the genes associated with migraine in GWAS and those involved in the response to stress, which could constitute adaptive mechanisms to chronic pain and stress. PTSD is a frequent comorbidity with migraine, which negatively impacts its prognosis, suggesting its importance as a chronification factor, and the need to investigate and address it in the headache clinic, especially in patients with CM and RM.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA MIGRAÑA.

La cefalea es el síntoma neurológico más frecuente y el principal motivo de consulta en los servicios de Neurología (1,2). Las cefaleas se clasifican en primarias o secundarias, según exista o no una causa orgánica subyacente. Las cefaleas primarias, que implican el concepto de cefalea como “enfermedad”, son las más frecuentes (3), y comprenden la cefalea tipo tensional, la migraña, la cefalea en racimos y otras cefaleas neurovasculares. Dentro de ellas, la cefalea tensional es la más frecuente, seguida de la migraña, representando entre ambas un 90% de todas las consultas por cefalea (3).

La migraña es la segunda cefalea primaria en términos de frecuencia, y la primera en términos de discapacidad. Constituye aproximadamente el 20% de las consultas especializadas de Neurología en nuestro país (1,2). Es una enfermedad común, cuya prevalencia es de aproximadamente un 15% para las formas comunes de la enfermedad (migraña episódica con o sin aura) (4,5), y de aproximadamente un 2,5% para su forma crónica (migraña crónica) (6,7). Presenta un claro predominio femenino a partir de la pubertad, siendo 3 veces más frecuente en las mujeres (4,8).

La migraña se caracteriza por dolores de cabeza, disfunción del sistema nervioso autónomo y, en algunos casos, alteraciones neurológicas transitorias denominadas aura. Se manifiesta en forma de crisis o ataques, entre los cuales el paciente se encuentra asintomático, y que se pueden desencadenar por diversos factores como el estrés, la falta de sueño, algunos alimentos y el ciclo hormonal femenino. La frecuencia de presentación de las crisis es muy variable a lo largo de la vida y entre diferentes individuos. Habitualmente debuta con episodios muy esporádicos en la adolescencia y alcanza la máxima frecuencia de ataques en la cuarta o quinta década, un periodo de la vida en el cual el estrés por el trabajo, la familia y el entorno social suele ser máximo.

Los episodios migrañosos cursan con dolor de localización generalmente unilateral, de carácter pulsátil e intensidad moderada o severa, pudiendo asociar náuseas, vómitos, fotofobia y/o fonofobia. El diagnóstico es exclusivamente clínico, para lo cual la Sociedad Internacionales de las Cefaleas (IHS; del inglés, International Headache Society) elaboró unos criterios que han sido actualizados por última vez

en 2018, y se conocen con las siglas CIC-3 (3ª edición de la Clasificación Internacional de las Cefaleas) (9). Los criterios empleados para la selección de casos en la presente Tesis Doctoral fueron los de la versión anterior, CIC-3β (10), del año 2013 (Tabla 1).

Tabla 1.- Criterios diagnósticos de la migraña sin aura (CIC-3β)

A.	Al menos 5 crisis que cumplan los criterios B-D.
B.	Crisis de cefalea que duran entre 4 y 72 horas (no tratadas o tratadas sin éxito).
C.	La cefalea presenta, al menos, 2 de las siguiente 4 características: C.1 Localización unilateral. C.2 Calidad pulsátil. C.3 Dolor de intensidad moderada o severa. C.4 Empeorada por, o condiciona el abandono de la actividad física habitual.
D.	Al menos 1 de los siguientes durante la cefalea: D.1 Náuseas y/o vómitos. D.2 Fotofobia y fonofobia.
E.	Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la CIC-3β.

*Estos criterios no han sufrido ninguna modificación en la versión CIC-3.

Clásicamente distinguimos dos subtipos: migraña con aura (MCA) y migraña sin aura (MSA). El aura es un conjunto de síntomas neurológicos transitorios que pueden preceder, acompañar o seguir al dolor de cabeza, y pueden ser visuales (en la mayoría de los casos, con síntomas positivos o negativos), sensitivos unilaterales, trastornos del lenguaje o incluso síntomas motores (que ocurren en la denominada migraña hemipléjica). La MSA es el tipo de migraña más frecuente (4), pudiendo presentar un mismo paciente tanto ataques de MSA como de MCA a lo largo de su vida. Para establecer el diagnóstico de MCA, se añade a los criterios anteriormente mencionados (9) la presencia de aura, tal y como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2.- Criterios diagnóstico de la migraña con aura típica (CIC-3β)

A.	Al menos 2 crisis que cumplan los criterios B y C.
B.	El aura comprende síntomas visuales, sensitivos y/o del lenguaje, todos ellos completamente reversibles, pero no presenta síntomas motores, tronco encefálicos ni retinianos.
C.	Al menos 2 de las siguientes 4 características: C.1 Progresión gradual de al menos 1 de los síntomas de aura durante un periodo ≥ 5 min, y/o 2 o más síntomas se presentan consecutivamente. C.2 Cada síntoma individual de aura tiene una duración de entre 5 y 60 minutos. C.3 Al menos uno de los síntomas de aura es unilateral. C.4 El aura se acompaña, o se sigue antes de 60 minutos, de cefalea.
D.	Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la CIC-3β y se ha descartado un accidente isquémico transitorio.

* Estos criterios tampoco han sufrido ninguna modificación en la versión CIC-3.

Las crisis de migraña resultan habitualmente incapacitantes, limitando al paciente para la realización de sus actividades cotidianas, tanto laborales, como familiares, sociales y lúdicas. Esta incapacidad, ocurre no sólo durante las crisis, sino también en el período intercrítico, por la ansiedad anticipatoria que produce el miedo a sufrir un ataque de migraña. Esto ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que ha incluido a la migraña entre las dolencias que condicionan un mayor número de años vividos con discapacidad, situándola en la octava posición en términos de pérdida de calidad de vida (11). Esta incapacidad, junto con la elevada prevalencia de la enfermedad, tiene además importantes consecuencias económicas y sociales que la han llevado a ser considerada un problema mayor de salud pública. En comparación con otras enfermedades neurológicas, se ha estimado que el coste económico de las cefaleas es el mismo que el de la epilepsia y la esclerosis múltiple juntos, y sólo por debajo del ictus y la demencia (12).

Migraña crónica.

La migraña crónica (MC) es una entidad que fue incluida por primera vez, como una complicación de la migraña, en la segunda clasificación de la IHS publicada en el año 2004, y como una entidad propia ya en la CIC-3 β (10). Se define como una cefalea que sufre el paciente durante al menos 15 días al mes, en (como mínimo) los últimos tres meses, y en los que al menos ocho de estos días tienen que cumplir los criterios estrictos de migraña, y en los otros siete días alguno de los criterios (Tabla 3).

Tabla 3.- Criterios diagnósticos de la migraña crónica (CIC-3 β)

A. Cefalea (tipo tensión o migrañosa) durante un periodo de 15 o más días al mes durante más de 3 meses que cumple los criterios B y C.
B. Aparece en un paciente que ha sufrido al menos 5 ataques que cumplen los criterios B-D para la migraña sin aura y/o los criterios B y C para la migraña con aura.
C. Durante un periodo de 8 o más días al mes por espacio de más de 3 meses cumple cualquiera de los siguientes: C.1 Criterios C y D para la migraña sin aura. C.2 Criterios B y C para la migraña con aura. C.3 Criterios A y B de probable migraña.
D. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la CIC-3 β

*En la clasificación CIC-3 el criterio C.3 se ha sustituido por: - En el momento de su aparición el paciente cree que es migraña, y se alivia con un triptán o derivados ergóticos.

Este conjunto de pacientes que cumplen los criterios diagnósticos de MC constituye un subgrupo de indudable mayor complejidad, con ciertas necesidades y dificultades específicas para el manejo clínico que deben ser tenidas en cuenta por los profesionales sanitarios.

La prevalencia mundial estimada de la MC oscila entre un 1 y un 3% (6,7,13,14), y la incidencia de transformación anual de una migraña episódica (ME) en una MC se estima en torno al 2-3% (13,14). La MC presenta, al igual que la variante episódica, un predominio en el sexo femenino, siendo en las mujeres entre 2,5 y 6,5 veces más frecuente que en los hombres. Los pacientes con MC en las series descritas presentan, asimismo, mayor edad media que los pacientes con ME (13,14).

Algunos trabajos han mostrado diferencias significativas entre las formas crónica y episódica de la migraña, no sólo en la frecuencia de la cefalea, sino, sobre todo con respecto a las comorbilidades y a la discapacidad asociada. El estudio *Americano de Prevalencia y Prevención de la Migraña* (AMPP; del inglés, *American Migraine Prevalence and Prevention Study*) (15) reveló, que sufrir una MC no sólo está asociado a la presencia de un dolor crónico, sino, que, además, estos pacientes presentan una mayor incidencia de enfermedades comórbidas y una mayor discapacidad.

Un subanálisis del estudio AMPP (16), realizado con el objetivo de evaluar el impacto económico de la MC, reveló que el grupo de pacientes diagnosticados de MC informaban mayor número de visitas médicas y mayor incidencia de absentismo laboral y escolar que los pacientes con ME, así como una pérdida de productividad mayor al 50% en los últimos 3 meses debido a las cefaleas. El coste anual por persona, incluyendo los costes directos e indirectos, fue 4,4 veces superior al de los pacientes con ME.

Resulta por todo ello importante identificar cuáles son los factores que confieren susceptibilidad a la MC o condicionan su transformación desde una ME.

1.2 GENÉTICA DE LA MIGRAÑA.

La migraña es una enfermedad multifactorial (17,18), lo que significa que está determinada por la interacción entre los genes y los factores ambientales. Su componente genético es importante, habiéndose estimado que la heredabilidad, o proporción del fenotipo que se debe a factores genéticos, de las formas comunes de la enfermedad (MCA y MSA) se encuentra entre un 40-60% (19). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por identificar los determinantes genéticos de la enfermedad, los resultados de los estudios de genética de la migraña han sido heterogéneos y escasamente replicados. Se debe de tener en cuenta que, considerando la elevada prevalencia de la migraña en la población general, es muy poco probable encontrar un único gen responsable, que debería tener una frecuencia muy superior a la de cualquier otra enfermedad genética conocida (17). La migraña es, por tanto, una enfermedad multifactorial con un componente genético poligénico, en la que participan múltiples variantes genéticas, algunas de ellas conocidas, que, como veremos, individualmente ejercen una influencia discreta, pero conjuntamente confieren un incremento significativo del riesgo de la enfermedad. En particular, no se conocen los genes que confieren susceptibilidad para la MC (20).

Los avances en genética de la migraña se pueden agrupar en dos etapas: por una parte, los estudios realizados antes de la existencia de los GWAS (del inglés, Genome-wide association studies; estudios de asociación del genoma completo), que llamaremos etapa pre-GWAS, y por otra, los estudios realizados desde su aparición, que constituirán la etapa GWAS.

Etapas pre-GWAS

El método clásico para investigar la importancia de los genes y de los factores ambientales en enfermedades como la migraña es el estudio de concordancia, o probabilidad de tener un mismo fenotipo, en gemelos mono y dicigóticos. Estos estudios reflejaron unas tasas de concordancia entre 1,5 y 2 veces superior en gemelos monocigóticos que en dicigóticos, tanto para el fenotipo MSA (21) como MCA (22), lo que demostró la importancia de los factores genéticos en la susceptibilidad a la migraña. No obstante, dado que la tasa de concordancia en

gemelos monocigóticos era inferior al 100%, esto revelaba también la implicación de factores no genéticos.

Los estudios de agregación familiar observaron también un incremento del riesgo tanto de MCA como de MSA en familiares de primer grado. Mientras que el riesgo de MSA era 1,9 veces superior, el riesgo de MCA se multiplicaba por 4 en familiares de primer grado, lo que sugirió un mayor peso genético para esta forma de migraña. Se observó, además, un incremento del riesgo de MSA entre los cónyuges, aunque en menor medida (1,5 veces), lo cual reflejó la importancia también de factores ambientales compartidos y apuntó a un modo de herencia multifactorial (17).

Los primeros hallazgos genéticos se realizaron en un infrecuente subtipo de migraña, la migraña hemipléjica familiar (MHF), que se caracteriza por ataques de migraña que se acompañan de debilidad hemicorporal, y por la existencia de un familiar en primer o segundo grado también afectado. Este tipo de migraña presenta una herencia mendeliana con transmisión autosómica dominante, en la que se han identificado mutaciones en 3 genes (*CACNA1A*, *ATP1A2* y *SCNA1A*) que codifican canales iónicos (23). La consecuencia última de estas 3 mutaciones es el incremento de los niveles de glutamato y potasio en la hendidura sináptica, elementos, ambos, facilitadores de la depresión cortical propagada (DCP). Sin embargo, aunque en este subtipo de migraña, la cefalea presenta las mismas características que en la migraña común, su prevalencia es tan sólo del 0,01% y no existe evidencia en la actualidad de asociación entre estos genes y las formas comunes de migraña (MCA o MSA) (18,23). Lo mismo ocurre con otros síndromes monogénicos que cursan con migraña como son CADASIL (arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía) y RVCL (vasculopatía retiniana con leucodistrofia cerebral). Sin embargo, estos primeros hallazgos genéticos abrieron las puertas para futuros descubrimientos.

Algunas estrategias para el estudio de la genética de una enfermedad son los estudios de asociación simple en casos y controles, que investigan determinados genes candidatos que codifican moléculas con un papel relevante dentro de la fisiopatología de la enfermedad y de los que sería probable esperar que existieran

variantes alélicas que alterasen la función de su producto, y los estudios de mapeo genético en familias multigeneracionales que segregan la enfermedad.

Entre los estudios de asociación simple en casos y controles ha habido gran cantidad de publicaciones que han identificado alrededor de 200 polimorfismos relacionados con la migraña, de los cuales pocos han podido ser replicados de forma consistente. Cabe destacar la asociación encontrada entre la mutación C677T del gen de la metilentetrahidrofolatoreductasa (*MTHFR*) y el riesgo de MCA (24). Los efectos de esta mutación se han relacionado con la alteración de la función del endotelio vascular. El *MTHFR* codifica para una enzima de la ruta de los folatos y la mutación C677T se correlaciona con una elevación de los niveles de homocisteína y un incremento de la susceptibilidad al estrés oxidativo, mediador de la disfunción endotelial. Esta asociación fue sugerida en estudios realizados en diversas muestras poblacionales, y en relación con cualquier tipo de migraña (25), o sólo MCA (26), según los estudios. Sin embargo, algunos metanálisis no han apoyado esta asociación (27), ni tampoco un gran estudio de casos y controles del Consorcio Internacional de Genética de las cefaleas (28). Aunque la estratificación de la población, donde una asociación significativa puede deberse a factores genéticos o factores de riesgo específicos de la población, puede sesgar los estudios de casos y controles o explicar la disparidad de resultados, los GWAS posteriores tampoco confirmaron la implicación de este gen.

El polimorfismo 5-HTTLPR del gen *SLC6A4*, que codifica para un transportador de serotonina, también ha sido objeto de múltiples estudios, con resultados dispares. La importancia de este neurotransmisor tanto en la fisiopatología de la migraña, como en comorbilidades frecuentes con ella, como la ansiedad y la depresión, sugería que pudiera existir una asociación. De esta manera, algunos estudios encontraron mayor frecuencia del alelo S de este polimorfismo en migrañosos (29). Sin embargo, otros estudios encontraron una asociación únicamente con la variante MCA (30), mientras que otros no encontraron ninguna influencia (31). Un metanálisis realizado en 2010, que analizó toda la evidencia existente sobre esta posible asociación, concluyó que el alelo S del polimorfismo 5-HTTLPR, proporciona únicamente un leve incremento del riesgo para cualquier tipo de migraña en mujeres europeas (32). Los portadores de este alelo tienen un menor

número de transportadores de serotonina, de forma que su aclaramiento es más lento y da lugar a un incremento de sus niveles en el espacio sináptico, lo que se propuso que aumenta el riesgo de migraña. Los GWAS realizados posteriormente no han identificado variantes de interés en este gen.

Entre los estudios realizados en familias, destaca la primera mutación que se descubrió en la MCA, que se encuentra en el gen *KCNK18*, que codifica para el canal de potasio TRESK. Este canal de potasio se expresa en las neuronas aferentes del ganglio del trigémino y de la raíz dorsal de la médula espinal, que están implicadas en la neurotransmisión del dolor, y regula su excitabilidad. La mutación descubierta (F139Wfsx24) cambia la pauta de lectura y causa pérdida completa de su función (33).

Etapas GWAS

Los estudios de rastreo genómico amplio, o GWAS, han resultado útiles en el estudio de múltiples trastornos complejos en los que los estudios de asociación simple han sido insuficientes para identificar sus determinantes genéticos. Estos estudios consisten en el análisis de asociación del genoma completo, y tratan de identificar si alguna variante genética (normalmente SNPs; del inglés single nucleotide polymorphism, polimorfismos de nucleótido simple) se asocia con algún rasgo o enfermedad. Las variantes que se encuentran asociadas se consideran señalizadoras de la región del genoma donde probablemente esté el problema causante de la enfermedad. Sobre ellas, se han de realizar estudios funcionales para tratar de explicar su implicación en la fisiopatología de la enfermedad.

Los GWAS realizados en migraña han identificado decenas de SNPs, que se encuentran en, o cerca de, genes implicados tanto en funciones neuronales como vasculares, siendo los más replicados los que se muestran en la Tabla 3.

No exentos de limitaciones, los GWAS precisan un gran tamaño muestral para contar con la suficiente potencia para detectar efectos genéticos. Esto se debe a que gran parte de la carga genética de las enfermedades poligénicas es soportada por un gran número de variantes alélicas que en conjunto proporcionan un gran riesgo relativo (expresado mediante odds ratio (OR) o razón de probabilidades), pero que

tienen una baja frecuencia alélica. Por otra parte, las variantes identificadas, en general, tienen un riesgo relativo bajo y contribuyen poco individualmente a la carga genética global.

En el primer GWAS, el de Anttila et al en 2010, participaron investigadores de 40 centros de toda Europa. En una primera fase se compararon los genomas de 2.748 pacientes con migraña seleccionados en consulta y clasificados según los criterios de la CIC-2, con 10.747 controles poblacionales, y se encontró la asociación entre una variante en el cromosoma 8 (el alelo menor (A) del rs1835740) y migraña de cualquier tipo (OR 1,23, IC 95% 1,150-1,324), siendo la asociación más fuerte con la MCA (OR 1,33) (34). La segunda fase, que sirvió de réplica de los resultados, estaba formada por una muestra de 3.202 pacientes y 40.062 controles, y obtuvo también una asociación positiva con esta variante, con una OR de 1,18 para cualquier tipo de migraña, y OR de 1,29 para la MCA. El polimorfismo rs1835740 se encuentra en el cromosoma 8q22, localizado entre dos genes, *PGCP* (glutamato carboxipeptidasa plasmática) y *MTDH* (Metadherina o también llamado *AEG1*, Gen 1 elevado astrocitario), y modifica la expresión del segundo. *MTDH/AEG1* está implicado en la homeostasis del glutamato a través de la infrarregulación del principal transportador de este neurotransmisor en el cerebro (EAAT2). Se propuso que la mayor expresión de este gen daría lugar a un acúmulo de glutamato en la hendidura sináptica, elemento facilitador de los mecanismos de la migraña.

El segundo GWAS fue el realizado en 2011 por el Consorcio holandés-islandés de genética de la migraña y con una base estrictamente poblacional, utilizando 2.447 casos de migraña seleccionados mediante cuestionarios y 8.534 controles sanos (35). En la fase de descubrimiento se obtuvo la asociación más significativa con el SNP rs9908234, en el gen *NGFR* (nerve growth factor receptor), pero esta asociación no se pudo confirmar en la fase de réplica en 3 muestras independientes adicionales. Tampoco otros 18 SNPs que habían resultado significativos se pudieron replicar con éxito. En un metanálisis de los genes candidatos previamente identificados, se encontró una asociación moderada con el gen *MTDH/AEG1* (18 de 29 SNPs en este gen tuvieron un valor $p < 0,001$; con una p global corregida por Bonferroni = 0,026), reforzando la implicación de este gen en la migraña. Sin embargo, el SNP identificado por Anttila (rs1835740) no se asoció con

migraña en este estudio. Se ha argumentado que el método de reclutamiento e identificación de los casos en este GWAS mediante correo y no en entrevista médica, puede inducir un sesgo de diagnóstico con inclusión de pacientes con migrañas menos severas y mayor heterogeneidad genética que los que se seleccionarían habitualmente en consulta de Neurología.

El siguiente GWAS, realizado también en 2011 con una base poblacional, incluyó exclusivamente mujeres reclutadas a partir del *Women's Genome Health Study*, 5.122 migrañosas y 18.108 controles sanas, e identificó otros 3 loci de susceptibilidad para cualquier tipo de migraña: rs651899 (1p36.32, cerca del gen *PRDM16*), rs10166942 (2q37.1, en el gen *TRPM8*) y rs11172113 (12q13.3, en el gen *LRP1*) (36). Estos SNPs fueron significativos en un metanálisis en 3 cohortes de réplica, pero no en la fase inicial de descubrimiento, y los tamaños del efecto fueron discretos (OR de 1,11; 0,85 y 0,90 respectivamente). El papel de *PRDM16*, que es un factor de transcripción, en la fisiopatología de la migraña, no está claro. *TRPM8* se expresa principalmente en las neuronas sensitivas del ganglio de la raíz dorsal y codifica para un sensor implicado en la transmisión dolorosa al frío. *LRP1* se expresa en numerosos tejidos incluidos el cerebro y los vasos sanguíneos y codifica para un receptor de lipoproteínas que interviene en funciones de modulación de la transmisión sináptica y se co-localiza en las neuronas con receptores del glutamato (NMDA), con el cual interacciona, apoyando de nuevo la importancia de este neurotransmisor en la migraña. Sin embargo, la asociación con el alelo rs1835740 del GWAS de Anttila (32), tampoco fue replicado.

En otro GWAS, en 2012, a partir de pacientes de consulta (2.326 pacientes con MSA y 4.580 controles poblacionales) se identificaron los dos primeros polimorfismos que conferían susceptibilidad de forma específica para la forma más común de migraña, la MSA (37). Uno en *MEF2D* y otro cerca de *TGF β 2*. El tamaño del efecto también fue discreto (OR del metanálisis 1,19-1,20 para ambos). *MEF2D* (factor potenciador de miocitos 2D) es un factor de transcripción altamente expresado en el cerebro que regula la diferenciación neuronal y cuya disregulación se cree que afecta a la neurotransmisión excitatoria dando lugar a la hipersensibilidad cerebral característica de la migraña. Además, el PACAP (péptido activador de la adenilatociclasa pituitaria), neurotransmisor implicado en el proceso

de inflamación neurogénica, es codificado por un gen regulado por *MEF2D*. Por su parte, *TGF β 2* (receptor 2 del factor de crecimiento β) está implicado en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, así como en la producción de matriz extracelular, y una mutación sin sentido en este gen se asoció con disección aórtica familiar y cefalea de tipo migrañoso en un estudio familiar multigeneracional. En este GWAS se replicaron además dos loci previamente descritos: los loci cercanos a *TRPM8* y *LRP1* del GWAS de Chasman et al (36), pero, de nuevo, el SNP en *MTDH/AEG1* de Anttila (34) no fue replicado.

Por último, un GWAS un tanto peculiar por su aproximación basada en pedigrí en la población de la Isla de Norfolk, en el Pacífico Sur, que desciende de un número pequeño de fundadores británicos y polinesios y tiene una alta prevalencia de migraña (25,5%; el doble que en la población caucásica no consanguínea), encontró asociación significativa con el polimorfismo rs4807347, localizado en *ZNF555* (proteína de los dedos de zinc 555), que disminuye el riesgo de migraña (38). Esta asociación fue replicada en una cohorte independiente (a partir de muestras del *Women's genome health study*), pero curiosamente, con el efecto opuesto. Aunque la función de esta proteína no está bien caracterizada, las proteínas de los dedos de zinc están implicadas en el reconocimiento del ADN, empaquetamiento del ARN, activación transcripcional, regulación de la apoptosis y plegamiento y ensamblaje de proteínas y en ratas, se han detectado cambios en la expresión de varias proteínas de dedos de zinc después de la DCP, sugiriendo un papel en la respuesta al estrés y en la reparación del ADN tras el ataque de migraña. Además, en este GWAS, se realizó un subanálisis estadístico según la prioridad biológica, que sugirió otros genes asociados a la migraña, entre ellos *ADAR β 2* (deaminasa β 2 de adenosina específica del ARN). Este gen pertenece a los genes de edición del ARN, sugeridos como candidatos para otros trastornos neurológicos y psiquiátricos como la epilepsia, la depresión y la esquizofrenia, y cuyo papel en migraña no está bien caracterizado.

Un gran estudio español de asociación de casos y controles, que pretendió replicar los genes descubiertos en los GWAS, incluyó 1.040 casos de migraña (clasificados en MCA o MSA según la CIC-2) y 1.037 controles, y encontró varios SNPs en varios genes TRP (receptores de potencial transitorio) asociados con

migraña, dos de los cuales fueron replicados en una muestra independiente: rs222741 en *TRPV1* (receptor de potencial transitorio valinoide tipo 1) y migraña de cualquier tipo y rs7217270 en *TRPV3* y MCA (39). Los TRP son una familia de canales iónicos, de los cuales el *TRPV1* se expresa en las membranas de las terminales nerviosas sensitivas del trigémino y juega un papel importante en el desarrollo de la sensibilización periférica. Este canal se activa en respuesta a estímulos térmicos, por lo que se planteó que este polimorfismo puede subyacer a los fenotipos de migraña con hipersensibilidad a los cambios térmicos.

Posteriormente se han realizado algunos metanálisis (40,41), que han confirmado algunos de los loci ya conocidos (los relacionados con *PRDM16*, *TRPM8*, *MEF2D*, *LRP1*, *TGF β R2*, *PHACTR1* y *ASTN2*) y sugerido otros, todos ellos con OR discretos entre 0,8 y 1,2. El último de estos metanálisis, en 2016 (41), amplió a 38 el número de loci identificados de susceptibilidad a la migraña, y mostró un enriquecimiento de genes que se expresan a nivel del músculo liso, incluido el tejido vascular, reflejando la importancia de los mecanismos vasculares en la migraña.

En resumen, los estudios genéticos han identificado multitud de variantes que participan en diversas vías funcionales, apoyando el concepto de la heterogeneidad genética y la complejidad fisiopatológica de la migraña. Es importante también destacar que gran parte de los polimorfismos identificados se encuentran en intrones o regiones intergénicas, no codificantes, por lo que su función podría estar implicada en la regulación de la expresión de otros genes (23,41).

Tabla 4.- Principales factores genéticos de riesgo identificados en los GWAS de migraña. * Por orden de descubrimiento.

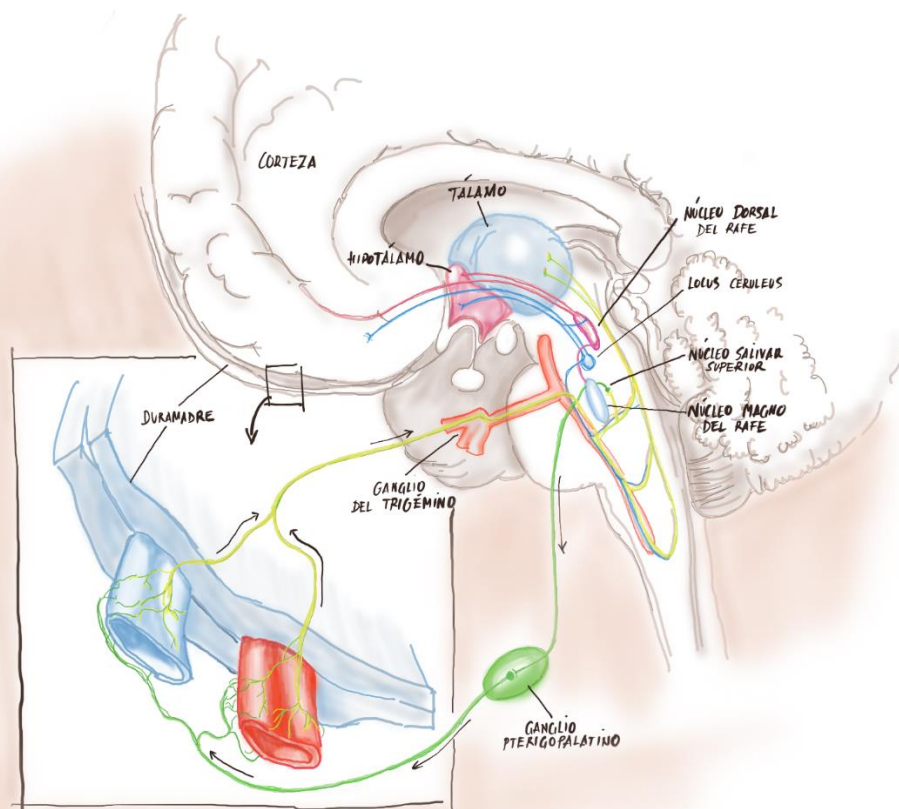
Polimorfismo	Gen	Efecto	GWAS
rs1835740	<i>MTDH/AEG1</i>	OR=1,23 Migraña OR=1,33 MCA	Anttila V, 2010.
rs651899	<i>PRMD16</i>	OR=1,11 Migraña en mujeres	Chasman DI, 2011.
rs10166942	<i>TRPM8</i>	OR=0,85 Migraña en mujeres	
rs11172113	<i>LRP1</i>	OR=0,90 Migraña en mujeres	
rs1050316 rs3790455	<i>MEF2D</i>	OR=1,20 MSA	Freilinger T, 2012.
rs7640543	<i>TGFβR2</i>	OR=1,19 MSA	
rs9349379	<i>PHACTR1</i>	OR=0,86 MSA	
rs6478241	<i>ASTN2</i>	OR=1,16 MSA	
rs4807347	<i>ZNF555</i>	Asociado con migraña. Efectos opuestos en las dos poblaciones testadas: β=0,941 β=-0,074.	Cox HC, 2012.
rs10903399 rs1046914 rs2271275 rs883248	<i>ADARβ2</i>	β=0,64-0,69 Migraña	
rs: Reference SNP; OR: Odds Ratio; β: Coeficiente de regresión.			

1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA

La fisiopatología de la migraña es compleja y aún no está completamente aclarada. Debería de dar explicación a todas las fases en las que se divide el ataque de migraña según su relación temporal con la cefalea: la fase prodrómica, que precede a la cefalea; el aura migrañosa, que ocurre inmediatamente antes o durante la cefalea; y la fase de dolor. No todos los ataques de migraña ocurren de la misma manera, de forma que estas fases se pueden superponer o alguna de ellas puede estar ausente.

Varias teorías se han propuesto para intentar dar explicación a este proceso, siendo actualmente la teoría neurovascular la más aceptada. Esta teoría considera que la migraña es un trastorno neurovascular (42–44), cuyo desencadenante inicial consiste en un fenómeno de origen neuronal, y en el que el dolor secundario tiene su origen en los vasos extracerebrales, sobre todo menínges. El cerebro es un órgano indoloro, mientras que las meninges (duramadre y leptomeninges: piamadre y aracnoides) son tejidos intracraneales sensibles al dolor. La duramadre está inervada por ramas de la primera división (V1- rama oftálmica) del nervio trigémino (V nervio craneal). Según esta teoría la cefalea es consecuencia de la activación del sistema trigémino-vascular (STV) que está formado por las meninges y los vasos sanguíneos corticales superficiales que están inervados por ramas del nervio trigémino. Las proyecciones aferentes del ganglio del trigémino convergen con estímulos de las regiones adyacentes de la piel, músculos pericraneales y paraespinales, y otros tejidos inervados por las raíces C1 y C2, antes de hacer sinapsis con las neuronas de segundo orden, en el complejo trigémino-cervical, que engloba al núcleo caudal del trigémino y la asta dorsal de la médula espinal cervical superior (segmentos C1 y C2). Las vías ascendentes del complejo trigémino-cervical transmiten señales a múltiples regiones del tronco-encéfalo, tálamo, hipotálamo y ganglios basales, que proyectan sobre áreas corticales implicadas en el procesamiento del dolor, así como el procesamiento cognitivo y emocional (42–44) (Figura 1).

Figura 1.- Sistema trigémino-vascular y estructuras implicadas en la génesis del ataque de migraña.



Modificado de Goadsby, *Migraine – Current understanding and treatment*, NEJM, 2002 (43).

La manera en que se activa el STV es un tema controvertido aún en la actualidad. Dada la complejidad de los mecanismos aparentemente implicados y la dificultad para explicar todas las fases del proceso, en el año 2001 Goadsby reflexionaba que la migraña no respeta la fisiología clásica del dolor y proponía buscar su explicación en una “percepción anormal de lo normal”, en lugar de en la activación de las vías nociceptivas de la forma clásicamente entendida (45).

Pródromos

La primera fase del ataque de migraña es la denominada fase prodrómica, que comprende un conjunto de síntomas que van desde la somnolencia y los bostezos, a cambios de humor, irritabilidad, caprichos alimentarios, dolor cervical y

dificultades de concentración. Ocurren en la mayoría de los pacientes, y se presentan en los días u horas previas a las crisis, o incluso, durante ellas. La aparición de estos síntomas en pacientes migrañosos es altamente premonitoria de la ocurrencia de un ataque de migraña en las siguientes 72 horas (46). El origen de estos síntomas se achaca a una disfunción hipotalámica como indicaron estudios con tomografía por emisión de positrones (PET) (47) y estudios de resonancia magnética (RM) funcional (48), que mostraron una activación del hipotálamo ipsilateral en la fase prodrómica de la migraña. El origen hipotalámico, a través de sus conexiones neuronales podría explicar la mayor parte de los síntomas prodrómicos, su asociación con los ritmos biológicos (con los ritmos circadianos o con el ciclo menstrual en la mujer), y su inicio ante cualquier alteración en la homeostasis corporal. Otros síntomas que pueden ocurrir en esta fase son la hipersensibilidad a la luz, que se ha correlacionado con un incremento de la actividad en el córtex occipital (49), y las náuseas, que se han asociado con una activación de algunas estructuras troncoencefálicas, como el núcleo del tracto solitario, el núcleo motor dorsal del vago y el núcleo ambiguo (50).

Aura

El aura es un fenómeno que ocurre en una minoría de los pacientes migrañosos. Se caracteriza por la instauración progresiva de síntomas neurológicos durante un periodo de entre 10-30 minutos en la mayoría de los casos. El aura migrañosa más frecuente es el aura visual, siendo la más típica la visión de una especie de escotoma paracentral de bordes festoneados que se va expandiendo a un promedio de 2-3 mm/min. Otros tipos de aura bastante frecuentes son la sensitiva (con hormigueos y pérdida de sensibilidad) y la disfásica (alteración del lenguaje). La menos frecuente es el aura hemipléjica (51).

Hoy en día se acepta que el fenómeno primario responsable del aura es una depresión funcional neuronal propagada por la corteza cerebral similar a la descrita experimentalmente por Leão (52). En los animales es posible producir una depresión funcional neuronal a partir de señales químicas o eléctricas en un punto, a partir de las cuales se produce una onda de despolarización neuronal y glial, con un flujo masivo de iones, seguida de otra onda de silencio eléctrico, con inhibición

tanto de la actividad espontánea como evocada, que se va ensanchando por la corteza cerebral. Estos cambios electrofisiológicos están asociados a cambios en el flujo cerebral, de manera que inicialmente hay una breve oligoemia, que se sigue de una profunda hiperemia de minutos de duración, y finalmente se produce de nuevo una oligoemia prolongada con palidez de la corteza de hasta 1 hora de duración.

Esta depresión neuronal propagada se debe a una onda de despolarización que avanza de forma lenta por la corteza cerebral a una velocidad de unos 2-6 mm/min, la misma a la que se calcula que progresa el escotoma del aura visual. La onda de despolarización se inicia por una elevación local del K^+ extracelular, que despolariza la membrana neuronal, y se cree que resulta de la despolarización y repolarización repetida de las neuronas corticales hiperexcitables. Esta salida masiva de K^+ al espacio extracelular, altera el gradiente iónico de la membrana, y se sigue de la entrada de iones Na^+ y Ca^+ y salida de aminoácidos excitadores como el glutamato (44).

La existencia de la DCP en humanos durante la crisis de migraña, se ve apoyada por estudios realizados con PET (53) y RM funcional (54), que muestran cambios en el flujo sanguíneo cerebral, durante la fase de aura, que se correlacionan con los síntomas experimentados por los pacientes. Algunos autores sostienen que la DCP es el fenómeno iniciador del ataque de migraña, mediante una sensibilización de los nociceptores meníngeos. A favor de esta teoría se encuentran estudios que mostraron que la DCP podía activar al STV en animales y con ello desencadenar el mecanismo de la cefalea (55), y el hecho de que algunos fármacos, capaces de prevenir la migraña, como el topiramato, han demostrado también suprimir e incrementar el umbral de inducción de la DCP experimentalmente en ratas (56). Sin embargo, es ineludible el hecho de que el aura sólo ocurre en un 15-20% de los pacientes migrañosos (4), lo cual indica que no es una condición necesaria, y la manera de activación del STV en los casos predominantes de MSA permanecería inexplicada. Aunque se ha hipotetizado que en estos casos el fenómeno del aura ocurre en áreas cerebrales silentes, esto no se ha podido demostrar (45). Por otra parte, tampoco es infrecuente la existencia de auras, que no se siguen de dolor. Un trabajo publicado en *Neurology* en el año 2000, revelaba que la ketamina administrada por vía intranasal era capaz de abortar el aura en algunos pacientes

con MHF, pero no la cefalea, sugiriendo que el sustrato neurobiológico de estos dos fenómenos es diferente (57).

Otra hipótesis es que exista un mecanismo de origen central que active de forma directa las neuronas trigémino-vasculares de segundo orden. Algunos experimentos mostraron que, la DCP puede activar directamente estas neuronas de segundo orden, sin precisar la conducción del estímulo a través del ganglio del trigémino que fue bloqueado con lidocaína (58), sugiriendo que además de la vía periférica, debe existir otro mecanismo de origen central, responsable de este proceso. Se ha hipotetizado entonces que, de forma independiente, el aura (DCP) por una parte, y la activación de la vía trigémino-vascular por otra, pueden ocurrir como resultado de un estado de hiperexcitabilidad cerebral en algunos individuos susceptibles, y que el hipotálamo, que se activa durante la fase premonitoria en respuesta a diversos estímulos ambientales que alteran la homeostasis corporal, sería el interruptor que iniciaría este estado de hiperexcitabilidad (42).

Dolor

El dolor de cabeza, o cefalea, es el síntoma más característico, intenso y discapacitante del ataque de migraña. La duración de esta fase, sin tratamiento, es de 4 a 72 horas. Suele empezar con una molestia débil que va aumentando en intensidad, alcanzando su máximo a la hora. En dos tercios de los pacientes el dolor tiene un predominio hemicraneal afectando a las sienes o a la zona periocular, siendo en el resto holocraneal. Dependiendo de los pacientes, la descripción del dolor varía, pudiendo ser de predominio opresivo o pulsátil. Por norma general, la cefalea empeora con los movimientos de la cabeza y el ejercicio físico, así como con la luz, los ruidos y los olores intensos. Esto obliga al paciente a tumbarse y permanecer a oscuras y en silencio, excepto en aquellos pacientes en quienes se asocia una hipersensibilidad del cráneo al tacto y el apoyo de la cabeza les incrementa el dolor. El dolor se puede acompañar de otros síntomas, como náuseas, vómitos y/o diarrea, que indican una disfunción del sistema autonómico, y puede haber, además, síntomas de activación parasimpática, aunque en menor medida que en las cefaleas trigémino-autonómicas, como edema periorbitario, enrojecimiento o palidez facial, inyección conjuntival, cambios pupilares, lagrimeo o congestión nasal.

La explicación clásica, considerada durante mucho tiempo, de la cefalea por una vasodilatación simple, se ha desestimado como causa fundamental, pero se sigue considerando como parte de la cascada de fenómenos que ocurren como consecuencia de la activación del STV. Sea cual sea la forma en que se activa, este sistema es ampliamente aceptado hoy en día, como responsable del dolor pulsátil de la migraña (44). Además del STV, otros dos elementos importantes intervienen en la fisiopatología del dolor: los núcleos del tronco cerebral, fundamentalmente el núcleo caudal del trigémino (NCT) y los núcleos aminérgicos – núcleo del rafe (serotoninérgico) y locus coeruleus (LC; noradrenérgico), y la corteza cerebral (Figura 1).

Se postula que los núcleos aminérgicos en personas predispuestas genéticamente reaccionan de manera anormal ante estímulos ordinarios y esta actividad anormal sensibiliza a su vez tanto a la corteza cerebral, como a otros núcleos del tronco (vestibulares, reflejo nauseoso...), y en especial, al NCT. La importancia de estos núcleos del tronco cerebral, denominados “generadores de la migraña”, se estableció a mediados de la década de los 90, al evidenciar un incremento del flujo mediante PET durante ataques espontáneos de migraña (59).

La activación de los núcleos vestibulares y del reflejo nauseoso explicaría algunos de los síntomas que ocurren con frecuencia en la migraña como son los vértigos y las náuseas, mientras que la hipersensibilidad anormal de la corteza sería la base para la tendencia a producir la DCP.

Por su parte, la activación del STV daría lugar a una activación de sus terminales nerviosas periféricas, que llevaría a un incremento en el flujo cerebral y a la liberación local de péptidos vasoactivos como el CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina), el VIP (péptido intestinal vasoactivo), la sustancia P y el PACAP, que inducirían el fenómeno conocido como inflamación neurogénica (44). Este fenómeno consiste en una cascada inflamatoria, mediada neurogénicamente, que se caracteriza por la dilatación y la activación del endotelio vascular, en la que tiene lugar la formación de vellosidades y vacuolas, con salida al espacio extravascular de proteínas plasmáticas provenientes de los vasos duros, que producen un incremento de la agregabilidad plaquetaria, degranulación de los

mastocitos y activación local de la respuesta inmune (60). El resultado final de este proceso es la estimulación de las aferencias nociceptivas (neuritas trigeminales), lo que produce una transmisión central de los impulsos de dolor. La inflamación neurógena coincidiría con el inicio del dolor de características pulsátiles típico de la migraña.

La activación del STV, conduce, por tanto, a una sensibilización de las neuritas trigeminales, fenómeno conocido como “sensibilización periférica”, lo que implica una disminución del umbral de respuesta ante estímulos duros, y un incremento en la magnitud de las mismas, y que explicaría la exacerbación del dolor con los movimientos cefálicos o con las maniobras de valsalva (44).

Además, se considera que, con la repetición de las crisis de migraña, se produce también una “sensibilización central” al estímulo doloroso trigeminal aferente hacia la sustancia gris periacueductal (SGP) y el tálamo, los cuales proyectan a su vez sobre los núcleos del rafe. Esta sensibilización central explicaría el fenómeno de alodinia cefálica y extracefálica (percepción de dolor ante estímulos inocuos) que experimentan muchos enfermos durante las crisis o incluso fuera de ellas, y que puede ser uno de los factores determinantes de la cronificación de la migraña (44).

Este sistema aferente recibe también conexiones corticales que son la base de la importante influencia que ejercen los estados psicológicos sobre la percepción del dolor (3). De esta forma, la sensibilización central en pacientes con migraña puede estar modulada o exacerbada por alteraciones psicológicas como la ansiedad o la depresión, que reducen el umbral del dolor y aumentan la excitabilidad cortical (61), incrementando el riesgo de transformación en MC.

1.4 BIOMARCADORES

Un biomarcador de enfermedad es una característica que puede ser medida de forma objetiva como indicador de un proceso fisiológico o patológico, de su gravedad y de la respuesta al tratamiento. Debe de estar vinculado a la enfermedad mediante una explicación fisiopatológica, su determinación debe de ser fiable y reproducible, y debe de tener utilidad para establecer el diagnóstico y el pronóstico (62,63).

A pesar de su gran prevalencia, no existe en la actualidad ningún biomarcador para la migraña, y su diagnóstico se realiza en base a unos criterios clínicos (9). Sin embargo, esto implica cierta subjetividad a la hora de establecer el diagnóstico, que se complica además en el caso de la MC donde las características del dolor son menos específicas, y coexisten con frecuencia varios tipos de cefalea crónica y otras comorbilidades (15) que dificultan la precisión en el diagnóstico y el manejo terapéutico (64).

Los esfuerzos por encontrar algún biomarcador para la migraña se han centrado sobre todo en aspectos de la neuroimagen funcional o estructural del cerebro y en determinantes bioquímicos vinculados con la fisiopatología de la enfermedad, algunos de los cuales describiremos a continuación, no existiendo en la actualidad ningún potencial biomarcador genético o epigenético para la migraña.

Biomarcadores de imagen

Estudios de neuroimagen han demostrado algunas diferencias en el cerebro de los pacientes con migraña en comparación con los controles, existiendo un mayor número de aberraciones en la función y en la estructura cerebral de los pacientes con MC.

Estudios de neuroimagen funcional han informado que los pacientes con migraña tienen una mayor activación ante estímulos dolorosos de algunas regiones cerebrales implicadas en el procesamiento del dolor que los controles (65). Otros estudios funcionales han demostrado que los pacientes con MC tienen una mayor activación del hipotálamo en respuesta a la estimulación dolorosa del nervio trigémino que los pacientes con ME (66) y que en estado de reposo, estos pacientes

muestran diferencias en la conectividad de algunas redes funcionales en comparación con los controles sanos (67,68).

Los estudios de neuroimagen estructural, también han demostrado algunas diferencias, de manera que, en comparación con los controles, los pacientes con migraña tienen menor volumen de la sustancia gris en algunas regiones cerebrales (69,70), y los pacientes con MC tienen mayor depósito de hierro en el núcleo rojo y en la sustancia gris periacueductal que los pacientes con ME y los controles (71).

Aunque algunos estudios han sugerido potenciales utilidades de estos descubrimientos para diagnosticar a los pacientes y predecir la respuesta al tratamiento, estas herramientas están todavía lejos de tener una utilidad a nivel individual para establecer el diagnóstico o el pronóstico de la enfermedad en la práctica clínica (72).

Biomarcadores bioquímicos

La activación del STV responsable del dolor de la migraña, produce la liberación de un número de péptidos vasoactivos en sus terminales nerviosos, cuyos niveles séricos se han propuesto como posibles biomarcadores para la MC, en la cual se piensa que existe una activación prácticamente permanente de este sistema.

CGRP

El CGRP es un péptido sensitivo muy abundante en el STV, que ha demostrado ser capaz de inducir migraña cuando se infunde en pacientes migrañosos (73). Este péptido se ha encontrado elevado de forma consistente en la circulación durante las crisis de migraña (74,75) y de forma interictal en pacientes con MC en comparación con pacientes con ME (76), reflejando su utilidad como marcador del fenómeno de sensibilización central que ocurre en estos pacientes. Se ha visto además que los niveles de CGRP son útiles para predecir la respuesta (77) y disminuyen en aquellos que responden al tratamiento con OnaBT (Toxina Botulínica tipo A) (78). Por último, los nuevos anticuerpos monoclonales que antagonizan el CGRP y su receptor han demostrado eficacia en el tratamiento de la migraña (79). Sin embargo, a pesar de ser el mejor candidato como biomarcador para la migraña, los estudios son todavía controvertidos (63), existe un porcentaje

no desdeñable de pacientes que tienen los niveles de CGRP en el rango de los controles sanos, demostrando que éste no es el único péptido importante en la fisiopatología de la migraña (80), y una gran cantidad de aspectos metodológicos en la técnica de determinación que están aún por aclarar (81).

VIP

El VIP es un péptido parasimpático con funciones vasoactivas que se libera en el brazo eferente del arco trigémino-facial. Su infusión intravenosa en migrañosos, a pesar de causar una marcada dilatación de los vasos craneales, no produce migraña (82). Los niveles séricos de VIP se encuentran elevados durante las crisis de migraña en pacientes que tienen síntomas autonómicos (75) y se encuentran también elevados interictalmente en pacientes con MC en comparación con controles sanos, aunque no se diferencian claramente de los pacientes con ME (83). Los niveles séricos de VIP también ayudan a predecir, aunque en menor medida que el CGRP, la respuesta a OnaBT (84) y se correlacionan con la presencia y cantidad de síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea (85). Estos estudios sugieren que el VIP podría ser un marcador de activación parasimpática en la MC.

PACAP

PACAP, se encuentra tanto en estructuras parasimpáticas como sensitivas del STV, y su infusión intravenosa induce ataques de migraña en un 58% de los migrañosos (86). Los niveles periféricos de PACAP en relación con la migraña difieren según los estudios. Mientras un estudio encontró niveles elevados en sangre de la vena yugular externa durante los ataques (87), otros no han encontrado diferencias ictales en comparación con los controles, e incluso han encontrado niveles séricos disminuidos interictalmente en pacientes con ME (88). Aunque esto también se ha sugerido que podría ser indicativo de un papel de PACAP en la fisiopatología de la migraña, el PACAP interictal no ha mostrado utilidad como biomarcador de la MC (89).

Otros péptidos

Se han estudiado otros péptidos, como el de origen glial S100B, que no ha demostrado diferenciar a los pacientes con MC o ME (90). Otros más recientemente sugeridos, como la amilina (91), precisa todavía más estudios.

1.5 COMORBILIDADES Y PERSONALIDAD.

Un aspecto importante de la migraña es la frecuente comorbilidad que asocia. El término comorbilidad se utiliza para denominar la asociación de dos enfermedades con una frecuencia más alta de lo esperado por mero azar (92). En este sentido, la migraña ha demostrado presentar comorbilidad con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular como la hipertensión, la diabetes, la hipercolesterolemia y la obesidad, y algunas enfermedades respiratorias como la bronquitis, el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (15). Además, es frecuente la coexistencia de trastornos psiquiátricos, entre los cuales, la migraña se ha asociado principalmente con trastorno depresivo mayor, trastorno bipolar, trastorno de pánico y fobia social (93). Estas comorbilidades son dos veces más frecuentes en los pacientes con MC que en la ME y se asocian con un peor pronóstico y una mayor discapacidad (15,93).

Pero, más allá de las comorbilidades psiquiátricas, también se ha discutido la posible existencia de una estructura de personalidad común a los pacientes migrañosos, que podría jugar un papel pronóstico y no tanto causal. Los rasgos de personalidad son aquellos patrones persistentes en la forma de percibir, relacionarse y pensar sobre el entorno y sobre uno mismo, que se ponen de manifiesto en una amplia gama de contextos sociales y personales. Estos rasgos, constituyen trastornos de la personalidad cuando se vuelven inflexibles y desadaptativos, y causan un deterioro funcional significativo o malestar subjetivo (94). En este sentido, se ha descrito que los pacientes con migraña tienen una personalidad rígida, perfeccionista, obsesiva y con mala tolerancia al estrés. Ya en 1937, Wolff definió la “personalidad migrañosa” (95), en un análisis de 46 sujetos con migraña, que mostraban repetidamente ciertos rasgos de personalidad que en determinadas situaciones de la vida podían dar lugar a reacciones emocionales disruptivas. Estas reacciones emocionales anormales o desproporcionadas, se traducirían, en pacientes predispuestos a la migraña, en ataques de dolor. Entre algunos de los rasgos que describía, se encuentran una marcada timidez durante la infancia, un excesivo apego materno, una mala tolerancia a la frustración, un sentido exagerado de la responsabilidad, un marcado perfeccionismo y una necesidad

llamativa de ser aceptado y admirado por los demás. En estos sujetos, la tensión psicológica mantenida, el esfuerzo excesivo, las ambiciones frustradas, la ansiedad por la seguridad familiar, financiera o personal, o una vida sexual insatisfactoria, proporcionarían las condiciones óptimas para la precipitación de los ataques de migraña. Pero lo cierto es que esta idea, que se sostuvo durante largo tiempo, se ha basado únicamente en observaciones clínicas y escasos estudios empíricos (96). Algunos investigadores en cefaleas han publicado estudios que tratan de evaluar la personalidad de los pacientes migrañosos, pero la mayoría de ellos no emplean unos criterios diagnósticos, metodologías ni grupos control claramente definidos, y apenas existen estudios de carácter poblacional (97). A pesar de estas limitaciones, es llamativo el hecho de que la mayoría de ellos apuntan de forma homogénea, a una tendencia al neuroticismo en pacientes migrañosos, rasgo de personalidad que se caracteriza por una importante inestabilidad emocional y altos niveles de ansiedad y preocupación.

También se ha descrito que los pacientes con migraña presentan estrategias de afrontamiento poco adaptativas, manifestando respuestas cognitivas y emocionales negativas ante el dolor; lo que se ha denominado “catastrofismo de la experiencia dolorosa”, y que esto podría contribuir a exacerbar la enfermedad (98,99).

1.6 MECANISMOS DE CRONIFICACIÓN DE LA MIGRAÑA

Dado el impacto social y económico de la MC, resulta importante identificar aquellos factores que pueden contribuir a la progresión de la migraña. Aunque se sabe poco acerca de los mecanismos biológicos subyacentes, y se desconocen los factores genéticos que confieren susceptibilidad a este subtipo de la enfermedad (20), se han identificado algunos factores de riesgo, tanto modificables como no modificables (Tabla 5), para la cronificación de la migraña (13,14,100). La heterogeneidad de estos factores indica que no existe una única vía que determine su cronificación.

Tabla 5.- Factores de riesgo para la migraña crónica.

<u>No modificables</u>	<u>Modificables</u>
Sexo femenino	Abuso de analgésicos
Edad avanzada	Elevada frecuencia de los ataques
Predisposición genética	Baja eficacia del tratamiento sintomático
Intensidad grave de la cefalea	Abuso de cafeína
Alodinia cutánea	Eventos vitales estresantes
Etnia caucásica	Trastornos afectivos (ansiedad, depresión)
Bajo nivel educacional y/o socioeconómico	Trastornos del sueño
Maltrato y/o abusos sexuales en la infancia	Trastornos de dolor crónico (fibromialgia)
Traumatismo craneoencefálico	Obesidad

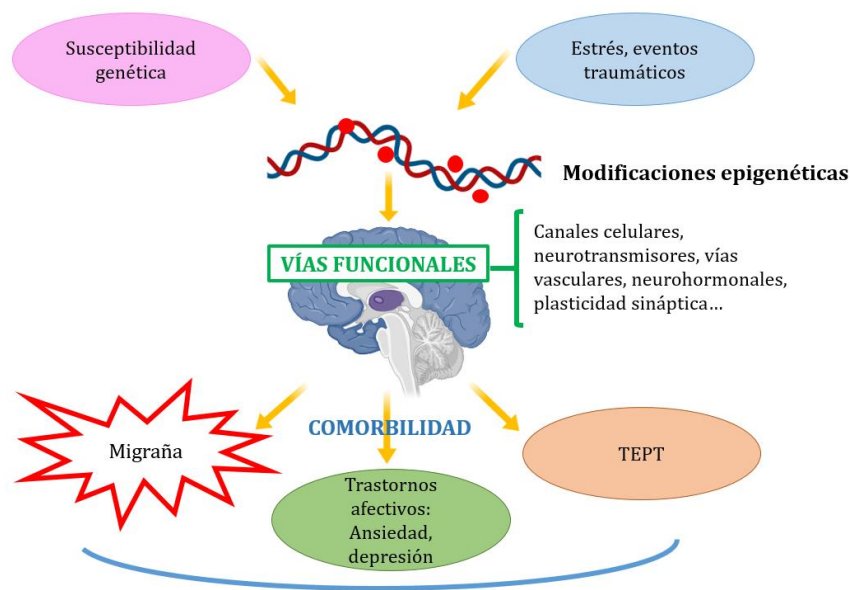
Modificado de Carod-Artal et al. Migraña crónica: definición, epidemiología, factores de riesgo y tratamiento. *Revista de Neurología*, 2012 (13).

Estrés y migraña.

El estrés juega un papel importante en los mecanismos de la migraña por diferentes motivos. En primer lugar, es tanto un desencadenante del ataque agudo (101), como un factor de riesgo para su cronificación (13,14,100). En segundo lugar, constituye con frecuencia un antecedente común (en forma de estrés precoz, eventos vitales estresantes o trastorno por estrés postraumático) de la migraña y de otras de sus comorbilidades como los trastornos afectivos (102).

El sistema de estrés es un sistema altamente sujeto a la modulación epigenética por las influencias del ambiente y está notablemente implicado en el desarrollo del sistema nervioso (103). Múltiples estudios en animales, demuestran cómo el estrés precoz, inducido más habitualmente por la separación precoz de la madre, produce modificaciones epigenéticas a nivel cerebral en diversos genes que condicionan cambios en el comportamiento a largo plazo (104–112). Aunque estos estudios son más difíciles de realizar en humanos, existe un estudio que analizó el nivel de metilación del promotor de *NR3C1*, que codifica para el receptor de glucocorticoides, en los hipocampos de adultos víctimas de suicidio que habían sufrido abusos en la infancia (113), y lo comparó con aquellos individuos que no los habían sufrido, encontrando una mayor metilación en los primeros, lo cual se correlacionó con una menor expresión del gen en dicha localización. Se propuso que una menor expresión de este receptor, por un déficit de feedback negativo, daría lugar a una hiperactividad del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA), y, en consecuencia, a una hiperreactividad al estrés. Este estudio demostró, en humanos, como el estrés temprano puede modificar el epigenoma y provocar consecuencias en el funcionamiento cerebral a largo plazo.

Pero además del sistema de estrés, también la vulnerabilidad al dolor está determinada por factores genéticos y no genéticos, pero hereditarios, modulados por exposiciones ambientales, que conducen a cambios en la expresión génica (114,115). Por ello, sería posible especular que vías comunes entre la respuesta al estrés y la fisiopatología del dolor en la migraña, podrían estar moduladas epigenéticamente en sujetos en los que coexisten patologías con el estrés como antecedente común (Figura 2).

Figura 2.- Relación entre el estrés, la migraña y otras comorbilidades.

Modificado de Dresler et al. Understanding the nature of psychiatric comorbidity in migraine: a systematic review focused on interactions and treatment implications. *The Journal of Headache and Pain*. 2019 (102).

Trastorno por estrés postraumático

Los trastornos de la esfera afectiva, tanto la ansiedad como la depresión, han sido las comorbilidades psiquiátricas más estudiadas en migraña (102), pero también, aunque con un menor nivel de evidencia, se ha estudiado la relación entre la migraña y el trastorno por estrés postraumático (TEPT).

Algunos investigadores en EE. UU han informado una mayor prevalencia de TEPT en migrañosos que en la población general y han propuesto su influencia en la cronificación de la migraña (116–118). Han observado, además, que la coexistencia de un TEPT en pacientes con migraña incrementa considerablemente la carga de la enfermedad (119). Dado que la prevalencia del TEPT es mayor en EE. UU, estos estudios podrían tener un sesgo local, y no existen estudios que hayan evaluado esta comorbilidad en nuestro país.

Por otra parte, no está claro si la mera exposición a un evento traumático (ET), sin que este haya condicionado el desarrollo de un TEPT, incrementa también el riesgo de sufrir migraña. El desarrollo de un TEPT depende de la exposición a un

evento vital sumamente traumático y se caracteriza por el desarrollo de síntomas intrusivos, conductas de evitación y alteraciones negativas en la cognición y el humor. Estos síntomas suelen aparecer en los 3 primeros meses posteriores al trauma, pero puede haber un lapso temporal de meses, o incluso años, antes de que los síntomas se pongan de manifiesto (94). Aunque la exposición a un ET es una condición necesaria para la aparición de un TEPT, no es una condición suficiente, como muestran los estudios epidemiológicos en los que la prevalencia de un ET a lo largo de la vida en la población general oscila desde un 39,1% hasta un 89,6% (120), mientras que la prevalencia del TEPT varía entre un 1% y un 12,3%, según el medio en el que se evalúe (121), lo que sugiere que la vulnerabilidad individual juega un papel en su desarrollo.

Algunos estudios retrospectivos han encontrado una asociación entre las experiencias adversas infantiles y el desarrollo de migraña en la edad adulta, y han demostrado además una relación entre dichas experiencias y la gravedad de la migraña (122). Otros autores, por el contrario, han sugerido que este incremento del riesgo ocurre únicamente ante ETs repetidos (123), y otros incluso, que ni la exposición a un ET, ni el número de ETs, únicamente el TEPT, predicen el diagnóstico de migraña (116).

El TEPT también se ha estudiado en relación con cambios epigenéticos, de manera que, por ejemplo, el promotor del gen *NR3C1* se ha encontrado hipometilado en sangre periférica en veteranos de guerra con TEPT (124). Esto sugiere que las modificaciones epigenéticas podrían mediar la asociación entre el TEPT y la migraña, pero son necesarios más estudios que aclaren esta relación y los potenciales mecanismos subyacentes.

1.7 EPIGENÉTICA

Generalidades.

La epigenética es un campo emergente en el estudio de múltiples enfermedades complejas, y en especial en el ámbito de la neurología, por ser el tejido nervioso un tejido ampliamente sometido a la regulación epigenética (125).

La epigenética estudia las modificaciones en la expresión de los genes que no ocurren por cambios en la secuencia de ADN, si no que, son inducidos por determinadas marcas químicas que se adhieren a la molécula de ADN, y que constituyen lo que se denomina “epigenoma”. Estos cambios biológicos no codificados en el ADN, que constituyen la firma epigenética de una célula, determinan cómo un genotipo (información genética que posee un individuo) converge en un fenotipo (conjunto de caracteres visibles de dicho individuo) (126).

En un organismo normal, cada tipo celular contiene su propio epigenoma, que determina la diferenciación de la célula para la realización de las funciones específicas de cada tejido, y participa en la estabilidad del genoma. Pero además de este epigenoma constitutivo, existe otro epigenoma que podríamos llamar “biográfico”, y que está condicionado por las influencias que recibimos de nuestro entorno. De esta manera, el ambiente, es capaz de dejar una huella en nuestro ADN y modificar la expresión de nuestros genes, lo cual ocurre principalmente durante el desarrollo temprano, momento en el que el organismo es más vulnerable, pero puede ocurrir a lo largo de toda la vida por factores como el estrés, la dieta y el estilo de vida. Es interesante el hecho de que las consecuencias funcionales de las modificaciones epigenéticas ocurridas durante el desarrollo temprano, pueden no manifestarse hasta la edad adulta, o el momento en el que tengan que entrar en juego los genes o las vías funcionales que han resultado modificados. Por otra parte, las consecuencias funcionales de las influencias ambientales difieren en función de los individuos y en función del sexo, lo cual sugiere la existencia de interacciones con factores genéticos.

La epigenética es un campo relativamente joven de la ciencia y muchos de sus aspectos son aún desconocidos. En general, se considera que las marcas

epigenéticas se caracterizan por ser estables y auto perpetuables a través de las sucesivas divisiones mitóticas, pero a la vez, por constituir un proceso dinámico y reversible (127). Aunque estas son las propiedades generales que se atribuyen a las marcas epigenéticas, algunas de ellas son específicas del mecanismo epigenético. Y es que existen varios mecanismos por los cuales se puede regular la expresión de los genes, algunos de los cuales implican metilación del ADN, modificación de las histonas y ARNs no codificantes. Estos mecanismos pueden inducir cambios localmente, afectando de forma individual a la expresión de un gen, o pueden provocar cambios más generalizados en el genoma (128).

Dentro de ellos, los patrones de metilación del ADN son los mejor estudiados y entendidos como marcadores de fenómenos epigenéticos.

Metilación del ADN y otros mecanismos epigenéticos.

Desde su descubrimiento a principios del siglo XX (129), múltiples estudios han demostrado que la metilación del ADN es fundamental para el proceso de diferenciación celular y el estado funcional de los genes. La metilación del ADN es la marca epigenética por excelencia, que tiene todas las propiedades que se atribuyen generalmente a los mecanismos epigenéticos y que participa en funciones de regulación de la transcripción génica y mantenimiento de la estabilidad genómica. Para hablar de los patrones específicos de metilación del ADN, nos referiremos a ellos en alguna ocasión como “metiloma”.

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo al carbono 5' de los residuos de citosina (C), dando lugar a una 5'-metilcitosina, reacción que es catalizada por las enzimas ADN metiltransferasas (ADNMT) (Figura 3). Esta reacción ocurre principalmente en las C que se siguen de G (guanina), es decir, en los dinucleótidos CpG (siendo la p, el fosfato que las une) (130). Estos dinucleótidos están infrarrepresentados en el genoma humano y aparecen constitutivamente metilados en su mayor parte. La adición de grupos metilo a las C, aumenta la mutabilidad de las metil citosinas a timinas, lo que explica la escasa proporción de CpGs en el genoma. La excepción son las llamadas islas CpG, regiones que presentan una alta densidad de estos dinucleótidos, superior a la esperada por mero azar, que se encuentran mayoritariamente en los promotores y en los exones

de los genes (130), y dentro de las cuales los dinucleótidos CpG se encuentran normalmente no metilados. Estas islas CpG son por tanto las regiones susceptibles de encontrarse diferencialmente metiladas por las influencias del ambiente y que pueden servir como marcadores epigenéticos de fenómenos biológicos.

Figura 3.- Esquema de la metilación del ADN.

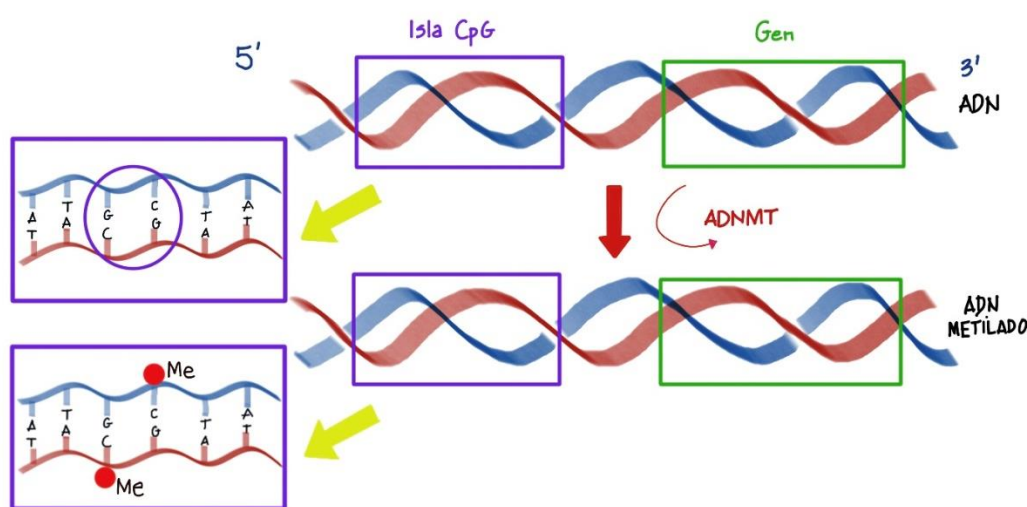


Ilustración propia.

Abreviaturas: CpG: dinucleótido Citosina-fosfato-Guanosina; ADN: ácido desoxirribonucleico; ADNMT: ADN metiltransferasa; Me: Grupo Metilo.

La metilación del ADN hace que el material genético sea menos accesible para la transcripción, por lo que típicamente se ha asociado con el silenciamiento génico. Sin embargo, hoy en día se sabe que su función es más compleja y depende del sitio en el que tenga lugar.

Los promotores génicos, que son los sitios donde se inicia la transcripción del gen, son generalmente regiones de cromatina abiertas para permitir el acceso de los factores de transcripción, de forma que, cuando encontramos metilada una isla CpG en un promotor génico, esto indica una alteración estructural de la cromatina, que se hace más compacta, e implica casi siempre el silenciamiento del gen. El mismo efecto ocurre cuando la metilación tiene lugar en el exón 1 del gen (131). Sin embargo, cuando la metilación ocurre en islas CpG localizadas en otras regiones del

cuerpo génico, por un mecanismo que es menos conocido, la metilación se relaciona con un incremento de la expresión (132).

Además, se conoce que la función de la metilación está íntimamente relacionada con la densidad de C metiladas, de manera que, alcanza su función (entendiendo por tal el silenciamiento génico) cuando un número suficiente de C se metilan cerca o dentro del promotor (133). Sin embargo, cuando la metilación ocurre en regiones de baja densidad de CpGs, es incapaz de bloquear la unión de factores de transcripción, y, por tanto, la metilación diferencial en estas regiones no implicaría necesariamente una alteración en la función, incluso conduciría a una demetilación pasiva (134).

Es importante comprender que los mecanismos epigenéticos no actúan de forma aleatoria, sino que tienen complejas interacciones con el código genético que podrían explicar una parte de las diferencias individuales en la regulación o disregulación de la metilación del ADN. Por una parte, se conocen polimorfismos en los genes de las ADNMT (135) que podrían producir diferencias en su función y en los patrones de metilación del ADN. Por otra parte, se sabe que algunos polimorfismos que se relacionan con una mayor o menor expresión génica (por lo que se les denomina de “alta o baja expresión”), se asocian con un mayor o menor nivel de metilación de su promotor. Ejemplo de esto es la regulación de la expresión del transportador de serotonina (*SLC6A4* o *5-HTT*). El “alelo corto” del polimorfismo de su promotor (5-HTTLPR), predice una menor expresión de 5-HTT, y se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar patologías afectivas. Pues bien, se ha visto que los portadores de este alelo, tienen niveles superiores de metilación en una isla CpG a nivel del promotor (136), lo que podría mediar la relación con su menor expresión. El mecanismo por el que se asocian el estado de metilación y el genotipo es desconocido.

También hay que mencionar que la edad, puede alterar los patrones de metilación del ADN, así como de otros mecanismos epigenéticos. En general, el envejecimiento se ha asociado con una hipermetilación de los promotores génicos, y una hipometilación global del ADN, reflejando probablemente un acúmulo de exposiciones ambientales a lo largo del tiempo (128).

Una de las características específicas de la metilación del ADN es que es altamente tejido-específica, de manera que influencias ambientales pueden inducir diferentes cambios en la metilación del ADN según el tipo celular. Por ello, para el estudio de biomarcadores epigenéticos, lo ideal sería utilizar el tejido más relevante para la enfermedad a estudio, pero, dada la dificultad de analizar el tejido cerebral en humanos, algunos estudios apoyan la utilización de tejidos accesibles como la sangre periférica (leucocitos), y con mayor motivo en aquellas enfermedades consideradas sistémicas (128), en las que las variaciones epigenéticas pueden trascender con mayor probabilidad al tejido cerebral. Además, se sabe que la variación en los patrones de metilación del ADN es menor entre el mismo tejido de diferentes individuos, que entre diferentes tejidos del mismo individuo, lo cual apoya la utilidad de las muestras de sangre periférica para realizar comparaciones interindividuales (137).

Otros mecanismos epigenéticos

Se conocen otros mecanismos epigenéticos, como la modificación de las histonas, que consiste en la metilación, acetilación, ubiquitinación o fosforilación de ciertos aminoácidos en las colas de las histonas, lo que produce una remodelación de la cromatina, importante en el control de la transcripción génica; y los ARNs no codificantes (entre ellos los miARNs), que son moléculas de ARN que no se traducen a proteínas y que tienen una gran variedad de funciones en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Los fundamentos de estos mecanismos, aunque también han sido investigados en algunos trabajos en migraña, son aún menos conocidos que la metilación del ADN, y se encuentran más allá de los objetivos de este trabajo.

Importancia de la epigenética y estudios de metilación del ADN en migraña.

En los últimos años ha crecido la evidencia de que los mecanismos epigenéticos juegan un papel importante en las enfermedades consideradas multifactoriales. Se sabe que las influencias del ambiente aumentan la predisposición a algunas enfermedades, y las modificaciones epigenéticas son un

mecanismo plausible para explicar la relación entre las exposiciones ambientales y los cambios en la expresión génica que pueden conducir a una enfermedad (130).

Cada vez existen más evidencias de la importancia de los mecanismos epigenéticos en la susceptibilidad a la enfermedad, y el ejemplo más conocido es el cáncer, en el que se pueden encontrar alteraciones epigenéticas en oncogenes y genes supresores de tumor, y en el que las terapias dirigidas contra dianas epigenéticas son ya una realidad.

Pero también existen cada vez más evidencias en las enfermedades neurológicas. El sistema nervioso, que es una estructura sumamente compleja en la que existe una importante variabilidad estructural y celular, es un sistema altamente dependiente de la regulación epigenética, y cada vez más alteraciones epigenéticas se asocian a enfermedades tanto del neurodesarrollo como de la neurodegeneración (125). Pero también existe una corriente creciente de su importancia en la migraña.

Como hemos visto, a pesar de los grandes esfuerzos, los GWAS de migraña han identificado algunos SNPs que individualmente confieren un discreto incremento del riesgo, y algunos de los cuales no se han podido replicar de forma consistente, de manera que se considera que sólo han conseguido dar explicación a una fracción de la heredabilidad de la migraña. Una posible explicación es que el ADN no sea el único portador de la información heredable de la enfermedad. Además, de los SNPs identificados, gran parte se encuentran en regiones no codificantes del ADN, por lo que se especula que estos SNPs se encuentren en regiones reguladoras de la expresión génica (128).

Por primera vez, en 2008, se hipotetizó que los cambios epigenéticos podían intervenir de forma significativa en la fisiopatología de la migraña, y se propuso un modelo comportamental, según el cual, las cefaleas primarias se interpretan como comportamientos, y no síntomas, conservados evolutivamente por su valor adaptativo y generados por una red de patrones en el cerebro que señalan un desequilibrio homeostático condicionado epigenéticamente (138).

Algunos otros hechos que apoyan la implicación de los mecanismos epigenéticos en la fisiopatología de la migraña son, por ejemplo, la importancia del

gen *MTHFR*, identificado en los estudios de asociación simple, que codifica una proteína importante en el ciclo de la metilación del ADN, y la efectividad del ácido valproico como tratamiento profiláctico, pues entre sus mecanismos de acción se encuentra la inhibición de la metilación del ADN (139). Además, de los polimorfismos identificados en los GWAS, al menos los relacionados con *MTDH/AEG1*, *MEF2D* y *PRDM16*, están también implicados en procesos epigenéticos, siendo capaces de interaccionar con enzimas implicadas en el posicionamiento de marcas específicas en la cromatina para regular la expresión de otros genes (139).

Pero especialmente en la MC, para la que no se conocen los factores genéticos de riesgo, y sí múltiples factores ambientales que favorecen su aparición (20), los mecanismos epigenéticos podrían constituir un elemento central en su fisiopatología. Estos mecanismos tienen el potencial de vincular las influencias ambientales con cambios en la expresión génica que conducen al fenotipo de una enfermedad, y podrían, por tanto, explicar, cómo algunos factores ambientales como las hormonas sexuales femeninas, el estrés, la inflamación y la alta frecuencia de las crisis, disminuyen el umbral y modulan la frecuencia de los ataques, dando lugar a las formas más graves de migraña (139).

Respecto a estos factores, se sabe que las hormonas sexuales femeninas ejercen sus efectos a través de receptores nucleares que regulan la programación epigenética de sus genes diana. Por su parte, los sistemas de estrés e inflamación, son sistemas altamente sujetos a la programación ambiental a través de mecanismos epigenéticos. Y, por último, y muy importante, la propia frecuencia de los ataques, a través de un incremento de la actividad neuronal, ha demostrado también producir modificaciones epigenéticas a nivel cerebral, fundamentalmente en genes de neuroplasticidad (139).

Estudios de metilación del ADN en migraña

A pesar de estas evidencias, son todavía escasos los estudios de metilación del ADN en la migraña, y los estudios existentes han abordado el tema desde diferentes perspectivas y metodologías.

Un estudio en animales, en 2011, investigó si los mecanismos epigenéticos son los responsables de la expresión específica celular del gen *CALCA*, que codifica

para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), principal neuropéptido implicado en la fisiopatología de la migraña, y para la hormona calcitonina, como productos de *splicing* alternativos. La expresión de este gen se limita normalmente a células endocrinas y neuronales, mientras que no se expresa en la glía. Para este estudio se utilizaron líneas celulares comerciales de rata y humanas y cultivos primarios de glía de ganglios trigéminos de rata, y se midieron la metilación del ADN y la acetilación de las histonas en una isla CpG cercana a una región potenciadora de este gen, que está activa en las neuronas e inactiva en la glía. Se observó que la metilación del ADN y la acetilación de la histona H3 de esta isla CpG se correlaciona con la expresión del gen *CALCA*, encontrándose hipometilada en células que expresan el gen, e hipermetilada e hipoacetilada en células que no lo expresan, como las células de la glía. Esto indica que el patrón específico celular de metilación del ADN y acetilación de histonas podrían explicar el silenciamiento del gen *CALCA* en algunos tipos celulares. Además, en este estudio se midió la consecuencia funcional de alterar el estado de la cromatina mediante mediciones cuantitativas del ARNm de la calcitonina y de CGRP tras la utilización de un inhibidor de la metilación, la 5-aza-2'-desoxicitidina, y un inhibidor de la deacetilasa de histonas, la tricostatina A. El tratamiento del ADN con 5-aza-2'-desoxicitidina indujo la expresión del gen *CALCA* tanto en células humanas como de rata y cultivos de glía, siendo el producto predominante el ARNm de la calcitonina. Mientras que el tratamiento con tricostatina A de forma aislada no tuvo efecto, el tratamiento combinado de tricostatina A y 5-aza-2'-desoxicitidina mostró un efecto sinérgico muy potente en la inducción del gen *CALCA* en la glía, indicando que la metilación del ADN es necesaria para que se manifieste el efecto de la acetilación de histonas, y es, por tanto, la llave determinante para la expresión específica celular de este gen. Este estudio concluye que la modulación epigenética es suficiente para la inducción de la expresión del gen *CALCA* en la glía, y propone que la inflamación neurogénica puede ser el estímulo para su inducción (140).

En 2013, Labruijere et al, analizaron la metilación de algunas islas CpG localizadas en los promotores de algunos genes potencialmente implicados en la génesis del ataque de migraña (entre ellos *CALCA*, *RAMP1*, *CGRP*, *ESR1* y *MTHFR*) en diferentes tejidos de la rata (duramadre, ganglio trigémino, núcleo caudado y aorta

torácica), y la compararon con su metilación en leucocitos humanos, con el objetivo de investigar la validez de este tejido para el estudio de la metilación de procesos que ocurren a nivel cerebral. Mientras que algunos genes estaban hipometilados en todos los tejidos, como el *CALCA*, *RAMP1* o el *MTHFR*, el estado de otros, como *ESR1* y *CGRP*, difería mucho entre tejidos. Los niveles de metilación en los leucocitos no mostraban correlación con los niveles de metilación en otros tejidos, sugiriendo que la metilación del ADN es tejido-específica y los niveles de metilación en leucocitos no son extrapolables a otros tejidos. Al comparar los niveles de metilación entre los leucocitos de la rata y leucocitos humanos a partir de los resultados de un EWAS previo, se observó que existía una elevada concordancia, lo que apoya la utilización de tejidos de la rata para el estudio de la metilación del ADN en tejidos humanos homólogos difíciles de obtener (141).

Otro estudio realizado con tejido neuronal obtenido de hipocampos de ratones adultos, demostró que la actividad neuronal sincrónica, que ocurre durante la DCP, conduce a cambios en la metilación del ADN cerebral en genes relacionados con la plasticidad neuronal (142), sentando una de las bases de la importancia de los mecanismos epigenéticos en la cronificación de la cefalea. En este estudio se utilizó un estímulo electroconvulsivo para inducir la actividad neuronal sincrónica, y se midieron los cambios en la metilación del ADN a las 0, 4 y 24 horas, con una resolución a nivel de dinucleótido CpG. Se obtuvo que las regiones CpGs modificadas eran principalmente regiones con baja densidad de CpGs, tanto intra como intergénicas, en contra de la concepción clásica de que la metilación *de novo* del ADN tiene lugar fundamentalmente en las islas CpG. Además, se observó que los cambios inducidos eran duraderos, manteniéndose en gran parte pasadas las 24 horas del estímulo, y la variación entre individuos fue muy pequeña. Las regiones CpGs intragénicas modificadas, mostraban un enriquecimiento en genes de plasticidad sináptica, diferenciación neuronal y vías de señalización del calcio. El análisis de expresión reveló, que la mayoría de los cambios en la metilación de CpGs no se correlacionó con cambios en la expresión génica, concluyendo que el control transcripcional debe requerir la interacción con otros mecanismos epigenéticos, y que estos cambios en la metilación podrían proporcionar el sustrato necesario para

otros procesos dependientes de la actividad neuronal que conduzcan eventualmente a cambios en la expresión génica.

En humanos, continuando con la importancia de la vía del CGRP, Wan et al. estudiaron el nivel de metilación del promotor del gen *RAMP1* (proteína modificadora de la actividad del receptor 1) en los leucocitos periféricos de 26 sujetos con migraña y lo compararon con 25 controles sanos. *RAMP1* codifica para una molécula transmembrana que forma parte del complejo del receptor del CGRP y se encuentra sobreexpresado en el sistema nervioso central de ratones que presentan alodinia y fotofobia, lo que sugiere un potencial papel de este gen en la migraña. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de metilación de los 13 sitios CpG detectados en la región promotora del gen (entre -300 y +205 pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción) entre migrañosos y controles, pero sí hubo una tendencia a la hipometilación en pacientes migrañosos (nivel medio de metilación: 8,41 % $\pm$ 1,92 % vs. 9,90 % $\pm$ 3,88 %, $p = 0,197$). El análisis estratificado reveló que la metilación en las unidades CpG +25, +27 y +31 desde el sitio de inicio de la transcripción, se asociaba significativamente con la historia familiar de migraña, y la metilación en los sitios +89, +94 y +96, se correlacionó con migraña en mujeres. Cuando la metilación en estos últimos sitios caía por debajo del 3,5%, el riesgo de migraña se incrementaba significativamente en mujeres (OR 7,313; IC 95%: 1,439-37,164). Este trabajo sugirió que la metilación en esta región del promotor *RAMP1* juega un papel en migraña y podría ser un biomarcador epigenético para predecir el riesgo de migraña en mujeres (143).

En 2018, el primer EWAS realizado en migraña, cuantificó los patrones de metilación del ADN en 67 casos seleccionados mediante un cuestionario validado, frente a 67 controles pareados por edad y sexo. Ninguna sonda de metilación individualmente alcanzó significación en todo el genoma, probablemente por una baja potencia estadística. Sin embargo, desde un enfoque de ventana deslizante, que permite capturar efectos reguladores de sitios CpG adyacentes, se identificaron algunos cambios en 62 regiones que estaban diferencialmente metiladas de forma moderada, y que se localizaban fundamentalmente en regiones reguladoras del genoma y en proximidad con genes implicados en el transporte de solutos y la homeostasis. La región más significativamente asociada con la migraña estaba

hipometilada y correspondía a 10 CpGs en el cuerpo del gen *SLC6A5* (Solute Carrier Family 6 Member 5), que codifica para un transportador presináptico de glicina con funciones de regulación de la percepción dolorosa en condiciones de inflamación y dolor neuropático crónico. Los transportadores de solutos también se han vinculado con numerosos trastornos psiquiátricos que son con frecuencia comórbidos con la migraña como la ansiedad, la depresión y el TEPT. Entre las conclusiones de este estudio, se invita a interpretar los resultados en el contexto de las importantes limitaciones metodológicas que albergan los estudios de metilación del ADN, y a diseñar nuevos estudios que permitan mejorar el control de las mismas (144).

También en 2018, Winsvold et al., publicaron el primer EWAS en cefalea crónica. En este estudio, se analizaron 485.000 sitios CpG en 36 mujeres con cefalea episódica que progresaron a cefalea crónica durante un periodo de seguimiento de 11 años, y los compararon con 35 controles pareados por edad y frecuencia basal de la cefalea, que no cronificaron durante el seguimiento. Los sitios CpG cuya metilación mostró una asociación más fuerte con la cronificación de la cefalea estaban relacionados con los genes *SH2D5* (dominio SH2 que contiene a la proteína 5) y *NPTX2* (pentraxina neuronal 2), expresados ambos a nivel cerebral e implicados en la regulación de la plasticidad sináptica (145). Como limitaciones de este estudio, además del pequeño tamaño muestral, los criterios utilizados para la categorización de los pacientes no permitían discernir la MC de otros tipos de cefaleas crónicas. En el análisis estratificado se descartó que el grado de metilación de estos genes estuviera en relación con el abuso de medicación, que podría ser un factor de confusión. Los hallazgos de este estudio apoyan el papel de la plasticidad neuronal en la cronificación de la cefalea, pero no permiten extraer conclusiones sobre si las modificaciones epigenéticas encontradas son causa o consecuencia de la repetición de las crisis de dolor. Teniendo en cuenta la lista más extensa de 200 sitios CpG identificados en la fase de descubrimiento, se observó un enriquecimiento significativo de genes involucrados en la homeostasis del calcio y en la señalización intracelular del receptor de estrógenos.

Por último, un estudio piloto en 2018, con un pequeño tamaño muestral, que comparó el grado de metilación del ADN en 25 pacientes con cefalea por abuso de medicación (CAM) (de los cuales el 61% cumplía criterios de MC), 18 con migraña

episódica y 13 controles sanos, encontró una hipermetilación en una isla CpG localizada en el gen *COMT* (catecol-o-metiltransferasa) en los pacientes con CAM en comparación con los controles sanos (146). Este gen codifica para una enzima que degrada las catecolaminas y es particularmente importante en el circuito de recompensa dopaminérgico involucrado en la adicción a sustancias y en algunas patologías psiquiátricas que son, con frecuencia, comórbidas con la migraña, como la depresión. Los resultados de este estudio sugieren un papel de la disregulación epigenética de la neurotransmisión dopaminérgica en la CAM.

Tabla 6.- Estudios de metilación del ADN en migraña.

Estudio	Tejido	Hallazgo principal	Vía funcional
Animales			
Park K-Y, 2011 (140).	Neuronas y células gliales del ganglio del trigémino en ratas.	La demetilación del promotor del gen <i>CALCA</i> es clave para su expresión neuronal.	CGRP.
Guo JU, 2011 (142).	Neuronas hipocámpales de ratones adultos.	La actividad neuronal sincrona produce cambios en la metilación del ADN.	Plasticidad sináptica, diferenciación neuronal, vías de señalización del calcio.
Labruijere S, 2014 (141).	Leucocitos (sangre periférica), aorta torácica, duramadre, ganglio trigémino y núcleo caudado de ratas. Leucocitos (sangre periférica) de humanos.	<i>CALCA</i> , <i>RAMP1</i> , <i>MTHFR</i> , <i>ESR1</i> y <i>CGRP</i> se metilan de forma tejido-específica. Existe una correlación entre los niveles de metilación en leucocitos de la rata y leucocitos humanos.	CGRP, metilación del ADN y vías hormonales.
Humanos			
Wan D, 2015 (143).	Leucocitos (sangre periférica)	Tendencia a la hipometilación del	CGRP.

		promotor <i>RAMP1</i> en migrañosos. La metilación de algunos sitios CpG se relacionaba con Hª familiar de migraña, y con riesgo de migraña en mujeres.	
Guerring ZF, 2018 (144).	Leucocitos (sangre periférica)	La hipometilación de una CpGi en el cuerpo del gen <i>SLC6A5</i> (chr11:20.625.538bp-20.628781bp) se asocia con migraña.	Vía serotoninérgica.
Winsvold BS, 2018 (145).	Leucocitos (sangre periférica)	La metilación de dos sitios CpG relacionados con <i>NPTX2</i> (cg11086695) y <i>SH2D5</i> (cg01010870) se asocia con la cronificación de la cefalea.	Neuroplasticidad
Terlizzi R, 2018 (146).	Leucocitos (sangre periférica)	La hipermetilación de una CpGi (chr10:76993892) en el gen <i>COMT</i> se asocia con cefalea por abuso de medicación.	Vías dopaminérgicas

2. HIPÓTESIS

2.1 FUNDAMENTOS

- La migraña es la patología neurológica más frecuente, que afecta a un gran porcentaje de la población en algún momento de su vida, y una enfermedad incapacitante, que genera importantes consecuencias sociales y económicas, lo cual hace que el interés por conocer sus causas y por mejorar su tratamiento sea fundamental.
- La fisiopatología de la migraña es compleja, con participación de factores tanto genéticos como ambientales, y aún no completamente conocida, siendo aún menos conocido el mecanismo por el cual se cronifica.
- Al ser una enfermedad tan prevalente, deben de ser diferentes los mecanismos de producción o las vías implicadas en su patogenia, lo cual limita la consistencia de los estudios genéticos y requiere una aproximación diferente a la realizada hasta el momento.
- Uno de los campos en auge, que adquiere creciente relevancia en el estudio de la cronificación de la migraña, es la epigenética, que tiene la capacidad de vincular las influencias ambientales con cambios crónicos que ocurren en el organismo y conducen al desarrollo de un fenotipo.
- El estrés es tanto un desencadenante del ataque agudo de migraña como un factor de cronificación, además de un sistema altamente susceptible a la modulación epigenética por las influencias del entorno.
- Es posible que los pacientes migrañosos, especialmente los crónicos, hayan sufrido con mayor frecuencia eventos vitales traumáticos, lo cual permitiría hipotetizar que vías epigenéticamente modificadas en respuesta al estrés puedan ser comunes a vías que participan en la cronificación de la migraña, determinando así una nueva explicación fisiopatológica en la que el entorno modifica o modula el fenotipo de migraña.
- El conocimiento de las causas por las que se produce la MC, facilitaría el desarrollo de terapias dirigidas, lo que conllevaría una mejoría en su pronóstico y con ello una reducción de su impacto económico y social.

2.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis principal de este trabajo es que la variabilidad genética de la migraña, puesta de manifiesto en los GWAS realizados hasta la fecha, podría estar condicionada, al menos en parte, por mecanismos epigenéticos, que podrían ser capaces, además, de modular el fenotipo de la enfermedad, conduciendo a las formas más graves de migraña (MC).

Se hipotetiza, además, que el estrés psicológico es uno de los factores ambientales capaces de incrementar el riesgo de MC en pacientes genéticamente predispuestos, a través de modificaciones epigenéticas.

De una forma más específica, hipotetizamos que podrían existir cambios en la metilación de algunos genes que participan en diversas vías funcionales implicadas en la fisiopatología de la migraña en pacientes con MC, y que podrían mediar, además, la relación entre el estrés grave y la MC.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

1. Investigar la presencia de modificaciones epigenéticas (más en concreto, de diferencias en la metilación del ADN) en algunos de los genes asociados a la migraña en los GWAS y algunos genes relacionados con la respuesta al estrés en pacientes con MC y ME.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Investigar el nivel de metilación de los genes cuyo nivel de metilación se ha asociado con la cronificación de la cefalea (*NPTX2* y *SH2D5*), en pacientes con MC y ME.
2. Estudiar la relación entre las modificaciones epigenéticas encontradas y el riesgo de MC, así como, su relación con marcadores clínicos y bioquímicos (CGRP, VIP y PACAP) de la migraña.
3. Investigar la frecuencia de experiencias traumáticas (ETs) y trastorno por estrés postraumático (TEPT) en pacientes con MC y ME y su impacto sobre marcadores clínicos, bioquímicos y otras comorbilidades de la migraña.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Diseñamos un estudio multicéntrico de casos y controles y corte transversal, que consta de una etapa clínica y una etapa experimental. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Cantabria con el número de expediente 2015.155 (ver documento de aprobación en material suplementario).

En la etapa clínica se seleccionaron los pacientes, que fueron clasificados en base a los criterios de la CIC-3 β en ME (MCA o MSA) y MC y se recogió la información clínica y demográfica en una base de datos preparada *ad hoc*. Se citó a los pacientes para acudir otro día a la consulta y proceder a la administración de cuestionarios estandarizados sobre síntomas asociados, gravedad de la migraña, comorbilidades y evaluación psicológica. Estos cuestionarios fueron auto o heteroadministrados, según el tipo de test y el perfil del paciente.

En la etapa experimental, se obtuvieron las muestras de sangre periférica para los análisis de laboratorio, que fueron procesadas y analizadas en el laboratorio del Grupo de Clínica y Genética de las Cefaleas del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

4.2 PACIENTES

Los pacientes se reclutaron de forma consecutiva, según la disponibilidad de tiempo en la consulta y su consentimiento para la participación en el estudio, entre marzo de 2016 y mayo de 2019, en dos centros médicos diferentes: dos consultas monográficas de Cefaleas del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), Santander (Cantabria) y una consulta de Atención Primaria del Centro de Salud Camargo Costa (Cantabria). Todos los participantes firmaron el consentimiento informado (CI) antes de su entrada en el estudio (ver CI en material suplementario).

Criterios de inclusión:

- Pacientes entre 18 y 65 años, con diagnóstico de migraña episódica (ME), con o sin aura, o migraña crónica (MC), en base a los criterios de la CIC-3 β , aplicados por un neurólogo o médico general cualificado.

- Pacientes con historia de migrañas de al menos un año de evolución y con exploración neurológica normal.

Criterios de exclusión:

- Se excluyó a los pacientes con cefaleas de características migrañosas de origen secundario.
- Se excluyó también a los pacientes cuyos calendarios de cefaleas aportaban insuficiente información clínica respecto a los últimos 3 meses.

Los controles sanos (CS), definidos como aquellos pacientes que nunca han sufrido cefalea de características migrañosas, fueron reclutados entre voluntarios sanos en la consulta de atención primaria y entre familiares y amigos de los pacientes y el personal sanitario. Todos los participantes contaron con una exploración neurológica normal antes de su inclusión en el estudio.

Del total de 575 migrañosos y 390 controles sanos que fueron reclutados en la base de datos de la Unidad de Cefaleas en este periodo de tiempo, se incluyeron en el estudio un total de 207 pacientes que cumplían los criterios de selección y emparejamiento por edad y sexo; 109 pacientes con migraña crónica (MC) y 98 con migraña episódica (ME) con (MCA) o sin aura (MSA) según CIC-3 β . Se incluyeron 98 CS emparejados por edad y sexo, de manera que la muestra final la constituyeron 305 individuos.

Se subclasificó además a los pacientes según los criterios de migraña refractaria (MR) de la Federación Europea de Cefaleas, definida como aquella migraña que ha fallado a todos los tratamientos preventivos disponibles y en la que hay al menos 8 días de dolor de cabeza debilitante durante al menos 6 meses consecutivos (147). Se utilizaron también los criterios CIC-3 β para clasificar a los pacientes que cumplían criterios de cefalea por abuso de medicación (CAM) (Tabla 7).

Tabla 7. - Criterios diagnósticos de la cefalea por abuso de medicación (CIC-3β).

A. Cefalea que ocurre al menos 15 días al mes en un paciente con una cefalea primaria preexistente.
B. Uso excesivo de medicación sintomática para la cefalea durante al menos 3 meses*.
C. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la CIC-3β.
*Consumo de AINES >15 días al mes, o consumo de triptanes >10 días al mes.

4.3 MUESTRAS

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas por una enfermera cualificada en la consulta de Neurología del HUMV de la vena antecubital en condiciones de ayunas.

Se extrajo 1 tubo vacutainer con EDTA en cada paciente. El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) es un anticoagulante que asegura la conservación de los elementos sanguíneos, para un amplio rango de análisis de laboratorio, entre ellos los análisis de la metilación del ADN.

Se extrajo otro tubo vacutainer sin anticoagulante para el análisis de los biomarcadores bioquímicos CGRP, VIP y PACAP.

En algunos participantes se obtuvo además una tercera muestra adicional de sangre periférica, en tubos Tempus™ Blood RNA (Applied Biosystem, CA, EE. UU.), para el análisis de expresión del ARN mensajero (ARNm).

Estos tubos se extrajeron y manipularon de forma específica en cada caso según el procedimiento descrito más adelante (etapa experimental).

4.4 GENES CANDIDATOS E ISLAS CpG

Bases para la selección de los genes

Para el análisis de la metilación del ADN, se seleccionaron un conjunto de genes con potencial relevancia en la fisiopatología de la migraña o en su cronificación, por su implicación sugerida en los GWAS (Tabla 8), o en la cronificación de la cefalea según un EWAS (Tabla 9).

Se seleccionaron otro conjunto de genes que se han demostrado epigenéticamente modificados en estudios de estrés precoz o postraumático, algunos de los cuales se han vinculado también con la fisiopatología de la migraña, y que hipotetizamos que podrían estar epigenéticamente modificados en la MC (Tabla 10).

Genes asociados a la migraña en los GWAS

Tabla 8.- Fundamentos para la selección de los genes asociados a la migraña en los GWAS.

Gen	Función	Estudio de asociación con la migraña
<i>PRDM16</i> (Dominio PR del factor de transcripción que contiene 16)	Codifica un factor de transcripción implicado en la adipogénesis marrón, en la producción de calor y en la obesidad (148). La obesidad es un factor de riesgo independiente para la migraña (149).	Un SNP en este gen (rs651899) se asoció con migraña en el GWAS de Chasman et al (36).
<i>TGFβ1</i> (Factor de crecimiento transformante β1)	Codifica un factor de crecimiento mediador de múltiples funciones astrocitarias. Participa en neuroinflamación y plasticidad sináptica y vascular (150,151).	Un SNP relacionado con este gen (rs1800469) se asoció con historia de cualquier tipo de migraña y MSA activa en un estudio de asociación multivariante realizado en una muestra de 25.713 mujeres (152).

ADARβ2 (Deaminasa de adenosina β2 específica de ARN)	Codifica una enzima de edición del ARN, necesaria para su procesamiento postranscripcional. Se expresa a nivel cerebral, pero su implicación en migraña no está claramente definida, aunque se cree relacionada con la liberación de neurotransmisores (153).	Varios SNPs en el gen <i>ADARβ2</i> (rs10903399, rs1046914, rs2271275, rs883248) se han asociado con migraña en la población genéticamente aislada de la isla de Norfolk (38).
MEF2D (Factor potenciador de miocitos 2D)	Codifica un factor de transcripción altamente expresado en el cerebro, que regula la expresión de PACAP, y que está implicado en la diferenciación neuronal y en la formación de sinapsis (154).	Este gen fue identificado en un GWAS en el que el SNP rs2274316 confería un leve incremento del riesgo de MSA (37).
TGFβR2 (Receptor β2 del factor de crecimiento transformante)	Codifica una proteína que forma parte de un complejo de receptores que regulan funciones sinápticas y endoteliales (151).	Este gen fue descubierto en un GWAS que reveló nuevos polimorfismos (rs7640543), en genes fundamentalmente implicados en funciones vasculares, que confieren susceptibilidad a la migraña (37). Se ha descrito una mutación en este gen en una familia que expresa migraña y disección aórtica familiar (155).
TRPV1 (Receptor transitorio de potencial catiónico subfamilia V miembro 1)	Codifica un receptor que participa en la modulación del dolor neuropático y está implicado en los fenómenos de alodinia y sensibilización central (39).	El SNP rs222741, en este gen, se asoció con migraña en un gran estudio de casos y controles en la población española (39).
ZNF555	Codifica un factor de transcripción de los dedos de	<i>ZNF555</i> (rs4807347) se asoció con migraña en el GWAS de Cox et al,

<i>(Proteína de los dedos de zinc 555)</i>	zinc. Los estudios funcionales de este gen son escasos. En relación a la migraña, se sabe que la DCP modifica la expresión de algunas proteínas de los dedos de zinc en la corteza cerebral (156).	realizado en la población de la isla de Norfolk (38).
MTDH/AEG1 <i>(Metadherina o Gen 1 elevado en astrocitos)</i>	Codifica una proteína implicada en la homeostasis del glutamato (34).	Un polimorfismo cercano a este gen (rs1835740, en 8q22), que incrementa la expresión del mismo, se asoció con migraña en el primer GWAS, siendo la asociación más fuerte con la MCA (34).

Genes relacionados con la cronificación de la cefalea (EWAS)

Tabla 9.- Fundamentos para la selección de los genes asociados a la cronificación de la cefalea.

Gen	Función	Estudio de asociación con la cronificación de la cefalea.
SH2D5 <i>(Dominio SH2 que contiene 5 proteínas)</i>	Codifica una proteína que se expresa en el cerebro humano y regula la plasticidad sináptica a través del control de los niveles de las proteínas Rac-GTP (145).	La metilación de dos sitios CpG en estos dos genes fueron los más fuertemente asociados con la cronificación de la cefalea en el primer EWAS realizado en cefalea crónica (145).
NPTX2 <i>(Proteína neuronal pentraxina II)</i>	Codifica una proteína altamente expresada a nivel cerebral y que participa en funciones de neuroplasticidad, en este caso inhibiendo las sinapsis excitatorias mediante la unión a los receptores glutamatérgicos AMPA (145).	

*Genes relacionados con la respuesta al estrés***Tabla 10.-** Fundamentos para la selección de genes implicados en la respuesta al estrés.

Gen	Función	Estudios que demuestran su modificación epigenética por estrés precoz
<i>NTSR1</i> (receptor 1 de la neurotensina)	Codifica el receptor 1 de la neurotensina, implicado en la regulación de la neurotransmisión dolorosa (157).	Estudios en ratas han demostrado que el estrés precoz incrementa la metilación del promotor de <i>NTSR1</i> y reduce su expresión a nivel de la amígdala cerebral, además de incrementar los síntomas de miedo condicionado (104).
<i>GRIN2β</i> (subunidad 2β del receptor ionotrópico NMDA del glutamato)	Codifica un receptor de glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador del cerebro.	La privación del cuidado materno altera la metilación de histonas en este gen en el hipocampo, con implicaciones en la memoria y el aprendizaje (105).
<i>ESR1</i> (Receptor de estrógenos tipo 1)	Codifica un receptor de estrógenos, que participa en las vías de señalización de las hormonas sexuales femeninas. Polimorfismos en este gen se han asociado con el riesgo de migraña (158). Los estrógenos regulan la excitabilidad neuronal a través de la modulación de la expresión de algunos receptores de neurotransmisores y canales iónicos que participan en la fisiopatología de la migraña.	El estrés precoz se asocia con una hipermetilación del promotor de <i>ESR1</i> y una menor expresión de este receptor en el hipotálamo (106).

CRF (factor liberador de corticotropina)	Hormona liberadora de corticotropina, que participa en el eje HHA mediador de la respuesta al estrés.	En roedores, la separación materna precoz provoca una menor metilación del promotor de este gen, y una mayor expresión del mismo a nivel del hipocampo, con consecuencias negativas sobre la plasticidad sináptica y la formación de memoria (107).
BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro)	Factor de crecimiento que participa en funciones de neuroplasticidad. BDNF juega un papel en la modulación central del dolor y en la fisiopatología de la migraña, habiéndose encontrado niveles séricos elevados durante las crisis (159).	Se han encontrado cambios en la metilación de este gen, que causan alteraciones en su expresión en la corteza prefrontal, en ratas adultas que habían sido sometidas a maltrato en la primera semana postnatal, pero también en su descendencia (108).
SLC6A4 (transportador de solutos de la familia 6, miembro 4)	También conocido como 5-HTT, codifica para el transportador de serotonina y participa en las vías de señalización de este neurotransmisor, involucradas tanto en la migraña (32) como en psicopatologías afectivas frecuentemente comórbidas (102).	Este gen también se encuentra sometido a la modulación epigenética por las influencias del ambiente postnatal, de manera que una isla CpG cercana a su promotor se hipermetila en relación a estrés precoz, conduciendo a una menor expresión del gen (109).
POMC (propiomelanocortina)	Es una prohormona de la adrenocorticotropina o ACTH, mediador clave de la respuesta adrenocortical al estrés.	El estrés precoz reduce la metilación en una región reguladora de este gen, modulando al alza su expresión (110).
GRM1	Codifica para un receptor del glutamato, por lo que participa	Se ha encontrado epigenéticamente modificado en roedores por variaciones en el

<i>(receptor metabotrópico del glutamato 1)</i>	en las vías de señalización glutamatérgicas.	cuidado materno postnatal, y esto se ha correlacionado con cambios en su nivel de expresión (111).
NR3C1 <i>(receptor de glucocorticoides)</i>	Codifica para un receptor de los glucocorticoides. Este es el gen más estudiado en relación con la respuesta al estrés.	Múltiples estudios han encontrado cambios en la metilación de este gen en respuesta a distintas adversidades (112,113,124).

Islas CpG

Para estudiar el nivel de metilación de los genes candidatos, se eligió una isla CpG relevante para cada uno de los genes, mediante la herramienta de trazado CpG del paquete de Software abierto europeo de Biología Molecular (EMBOSS) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss>), a través de la secuencia del gen obtenida de la base de datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

La descripción y la localización de las islas CpG estudiadas en relación con cada uno de los genes candidatos se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11.- Genes candidatos e islas CpG estudiadas.

Gen	Gene ID*	Tipo de isla CpG	Localización cromosómica
MIGRAÑA (GWAS)			
<i>TGFβ1</i>	7040	5' UTR	CRM 19: 41301975-41302123 bp
<i>ADARβ2</i>	105	3' UTR	CRM 10: 1178001-1178137 bp
<i>MTDH/AEG1</i>	92140	Exon 1	CRM 8: 97644695-97644898 bp
<i>MEF2D</i>	4209	3'-UTR	CRM 1: 156463749-156463893 bp
<i>PRDM16</i>	63976	5'-UTR	CRM 1: 3068717-3068774 bp
<i>TGFβR2</i>	7048	Intron	CRM 3: 30606977-30607086 bp
<i>TRPV1</i>	7442	5' UTR	CRM 17: 3566331-3566518 bp
<i>ZNF555</i>	148254	Intron	CRM 19: 2841631-2841781 bp
CEFALEA CRÓNICA (EWAS)			
<i>SH2D5</i>	400745	5' UTR	CRM 1: 201732592-20732369 bp
<i>NPTX2</i>	4885	Exon 1	CRM 7: 98617333-98617995 bp
ESTRÉS			
<i>NTSR1</i>	4923	5' UTR	CRM 20: 627708969-62709114 bp
<i>GRIN2β</i>	2940	-	CRM 12: 13438333-13438454 bp
<i>ESR1</i>	2099	Intron	CRM 6: 151880328-151880425 bp
<i>CRF1</i>	1394	3'-UTR	CRM 8: 66175776-66176569 bp
<i>BDNF</i>	627	3'-UTR	CRM 11: 27657455-27657558 bp
<i>SLC6A4</i>	6532	3'-UTR	CRM 17: 30194803-30194871 bp
<i>POMC</i>	5443	Exon 3	CRM 2: 25161312-25161426 bp
<i>GRM1</i>	2911	5' UTR	CRM 6: 146029301-146029484 bp
<i>NR3C1</i>	2908	Intron	CRM 5: 143307952-236778960 bp
UTR: Untranslated Region; CRM: cromosoma; bp: pares de bases.			
*Identificación del gen en NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)			

4.5 PROCEDIMIENTO

Etapla clínica: análisis de características clínicas y perfiles psicológicos

Además de clasificar a los pacientes según los criterios diagnósticos de la CIC-3 β en ME (MSA o MCA) y MC, se recogieron variables clínicas y demográficas y se administraron cuestionarios estandarizados para realizar una mejor caracterización clínica y una evaluación psicológica. Para ello contamos con un equipo multidisciplinar integrado por 2 neurólogos expertos en cefaleas y 2 psicólogos clínicos que nos asesoraron en la elección de los cuestionarios e interpretación de los mismos.

En la valoración clínica se incluyeron datos de: sexo, edad en el momento de inclusión en el estudio, edad al diagnóstico de la migraña, frecuencia de los ataques, síntomas de alodinia (Escala de alodinia cutánea), síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea, tratamientos sintomáticos y preventivos utilizados y eficacia de los mismos. Se recogieron además variables antropométricas (peso y talla; índice de masa corporal (IMC)) y se preguntó sobre la presencia de comorbilidades: factores de riesgo vascular (tabaquismo, consumo de alcohol, consumo de anticonceptivos orales, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), dislipemia o antecedentes de cardiopatía isquémica), fibromialgia (autoinformada) y coexistencia de cefalea tensional o cefalea por abuso de medicación (CAM). Además, se administraron escalas de severidad de la fatiga, discapacidad (MIDAS; del inglés Migraine Disability Assessment Score), impacto (HIT-6; del inglés Headache Impact Test-6) y percepción subjetiva del estado de salud (cuestionario de salud SF-12) para valorar la gravedad de las migrañas.

Para la valoración psicológica se administraron cuestionarios validados para medir: estrés postraumático (MINI Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional y Cuestionario para experiencias traumáticas (TQ)), depresión (Inventario de Depresión de Beck-BDI) y ansiedad (Inventario de ansiedad de Beck-BAI).

A continuación, se describen los cuestionarios y escalas utilizados, y sus principales propiedades psicométricas, que son aquellas que permiten determinar si una prueba o test es válido o no para la medición de una variable o conducta

psicológica previamente definida. Los cuestionarios y escalas propiamente dichos se adjuntan en el Material Suplementario.

A. Valoración clínica

ESCALA DE ALODINIA CUTÁNEA

La alodinia cutánea se caracteriza por la percepción de dolor ante estímulos sobre la piel que no son habitualmente dolorosos. Se considera un marcador de sensibilización central y un factor de riesgo de progresión a MC (44,100).

Se utilizó una escala de para medir alodinia cutánea que fue validada en 2008 por Lipton et al. en una muestra de 11.388 migrañosos (160). Un 63% de los migrañosos de la muestra presentaban alodinia cutánea, y su presencia se correlacionó con la frecuencia, severidad y discapacidad de la migraña, así como con síntomas definitorios de la misma (dolor intenso, unilateral, pulsátil y agravado por la actividad física, fotofobia y sonofobia, y la presencia de aura). Todos los ítems mostraron un adecuado valor discriminatorio. Interpretación: 0-2: no alodinia; 3-5: alodinia leve; 6-8: alodinia moderada; 9 o más: alodinia severa.

SÍNTOMAS AUTONÓMICOS CRANEALES RELACIONADOS CON LA CEFALEA

Utilizamos un cuestionario breve que interroga sobre 8 síntomas autonómicos craneales (sensación de plenitud facial y ocular, lagrimeo, enrojecimiento del ojo o de la cara, ptosis, sensación de arenilla en el ojo, congestión nasal o rinorrea) antes o durante la cefalea, y que el paciente debe responder si le ocurren nunca, alguna vez o a menudo. Se puntuó el número de síntomas referidos por cada paciente, lo que podía variar entre 0 (ausencia de síntomas autonómicos) y 8 (presencia de todos los síntomas autonómicos sobre los que se cuestionó).

ESCALA DE SEVERIDAD DE LA FATIGA

La fatiga es un síntoma común que se define como la dificultad para iniciar o mantener actividades voluntarias y que interfiere con las actividades diarias afectando a la calidad de vida de quienes la padecen (161). Algunos estudios apuntan a una mayor frecuencia de fatiga en los pacientes con migraña, sugiriendo

que pueda ser un síntoma específico de la enfermedad (162), y en especial de los pacientes con MC (163).

Se utilizó la Escala de severidad de la fatiga que fue desarrollada por Krupp et al. en 1989 (164), y consiste en 9 afirmaciones, seleccionadas de entre las características definitorias de la fatiga, en las que el individuo debe expresar su grado de acuerdo con una puntuación del 1 (totalmente de acuerdo) al 7 (totalmente en desacuerdo).

ESCALA DE DISCAPACIDAD DE LA MIGRAÑA (MIDAS)

Evaluar la discapacidad asociada a la migraña de una forma sistematizada es difícil dadas las grandes variaciones interindividuales en la experiencia dolorosa, así como las grandes variaciones que ocurren en un mismo individuo entre un ataque y otro. Lo que interesa es reflejar los efectos de la migraña de forma global en la vida del individuo, para lo cual resulta útil evaluarlos durante un periodo determinado de tiempo.

Así es como surgió el cuestionario MIDAS, un cuestionario breve, autoadministrado, diseñado para cuantificar la discapacidad asociada con la migraña durante un periodo de 3 meses, y que incluye 5 preguntas sobre limitaciones en diferentes aspectos (laborales, tareas domésticas, actividades sociales, familiares o lúdicas). En concreto las 5 preguntas hacen referencia al tiempo perdido en el trabajo y el trabajo en el hogar (una pregunta sobre días perdidos y otra sobre días con al menos un 50% de productividad reducida) y días perdidos de actividades no laborales. La puntuación final indica el nivel de discapacidad en 4 grados. Esta escala es una de las escalas más utilizadas para medir la discapacidad en pacientes con migraña y ha demostrado unas adecuadas propiedades psicométricas (165).

TEST DE IMPACTO DE LA CEFALEA (HIT-6)

Dado que la cefalea es una enfermedad severamente incapacitante, resulta esencial tanto para la práctica clínica como para la investigación, estandarizar la información ofrecida por los pacientes sobre el impacto de la enfermedad en su vida diaria. HIT-6 es un cuestionario breve, de 6 ítems, que ha demostrado ser fiable para

el *screening* y la monitorización del impacto de las cefaleas (166). Estos 6 ítems cubren varias áreas de impacto como son el dolor, las limitaciones sociales, el funcionamiento cognitivo, el sufrimiento psicológico y la vitalidad.

CUESTIONARIO DE SALUD SF-12

El cuestionario de salud SF-36 es uno de los instrumentos más utilizados para la evaluación de la calidad de vida relacionada con la salud. Varios trabajos realizados sobre la dimensionalidad de los instrumentos de medida de la salud, reflejan la existencia de dos dominios principales de salud: el dominio físico y el dominio mental. La definición de estos dos dominios permitió el desarrollo de una versión reducida del cuestionario, el SF-12, que era capaz de reproducirlos y que puede contestarse en un periodo más breve de tiempo (167). Esta versión reducida, consta de 12 ítems que exploran la salud física y mental en referencia a las últimas 4 semanas, y ha mostrado unas adecuadas propiedades psicométricas (168).

B. Valoración psicológica.

MINI ENTREVISTA NEUROPSIQUIÁTRICA INTERNACIONAL

Las enfermedades mentales se diagnostican fundamentalmente en base a unos criterios establecidos en el Manual diagnóstico y estadístico de las enfermedades mentales (DSM), del cual existen varias ediciones. Aunque estos criterios han demostrado ser precisos y fiables, en la práctica presentan cierta variabilidad, ya que en ocasiones su interpretación depende de la experiencia de quien los administra e incluso médicos experimentados pueden realizar un diagnóstico de manera más intuitiva sin acogerse estrictamente a todos los criterios. La recopilación de la información también varía en función de cómo sean realizadas las preguntas. Es por ello que las entrevistas estructuradas resultan de utilidad, pues emplean preguntas directas, de fácil respuesta, que están completamente ligadas a los criterios diagnósticos. Estas entrevistas disminuyen la variabilidad entre los entrevistadores.

La MINI Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional es una entrevista estructurada, dividida en módulos que se identifican por letras y que exploran los principales trastornos psiquiátricos del eje I del DSM-IV. El módulo I, explora los

síntomas de TEPT en el último mes y sus propiedades psicométricas se consideran válidas para su cribado tanto en la práctica clínica como en investigación (169).

Al comienzo del módulo, se presentan dos preguntas con el fondo en gris correspondientes a los criterios diagnósticos principales del trastorno. Al final del módulo hay otra casilla gris que permite al clínico indicar si se cumplen los criterios diagnósticos. Las respuestas con una flecha encima indican que no se cumple uno de los criterios necesarios para el diagnóstico, y en este caso se debe pasar directamente al final del módulo y rodear con un círculo NO en la casilla diagnóstica.

CUESTIONARIO PARA EXPERIENCIAS TRAUMÁTICAS (TQ)

Además de explorar la presencia de síntomas de TEPT a través de la MINI Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional, exploramos cuáles fueron los eventos traumáticos (ETs) desencadenantes, o en ausencia de criterios de TEPT, investigamos la proporción y tipo de ETs sufridos en nuestra muestra poblacional.

Para ello utilizamos el cuestionario para experiencias traumáticas (TQ) que consta de 3 apartados: el primero de 18 ítems que investigan la experiencia de ETs a lo largo de la vida, la edad en que se experimentaron y su duración; el segundo apartado de 9 ítems acerca de las características del ET marcado por el paciente como el más desagradable, y el tercer apartado, que evalúa las consecuencias de dicho ET en cualquier momento después del suceso, a través de 18 ítems ligados a los criterios de TEPT del DSM-IV (170). Cada ítem es contestado en un formato de respuesta de tipo dicotómico “no o sí” que se puntúa 0 ó 1. La puntuación total se obtiene de la suma de las respuestas afirmativas de los 18 ítems acerca de síntomas de TEPT, y va entre 0, que representa ausencia de síntomas de TEPT y 18, que representa la máxima gravedad de los síntomas de TEPT. La versión española de este test ha mostrado unas adecuadas propiedades psicométricas (171).

INVENTARIO DE DEPRESIÓN DE BECK-BDI

El inventario de depresión de Beck es uno de los más utilizados para evaluar la depresión desde su elaboración en 1961 (172) y ha demostrado unas adecuadas propiedades psicométricas (173). Está compuesto por 21 categorías de síntomas y actitudes, que exploran las manifestaciones típicas de la depresión, y consisten en

series de 4 ó 5 declaraciones graduales, calificadas del 0 al 3 para indicar el grado de severidad del síntoma. Las categorías de síntomas son: humor, pesimismo, sentido del fracaso, falta de satisfacción, sentimientos de castigo, auto odio, auto acusaciones, deseos de ser castigado, episodios de llanto, irritabilidad, abandono social, indecisión, imagen corporal, inhibición del trabajo, alteración del sueño, fatigabilidad, pérdida de apetito, pérdida de peso, preocupación somática y pérdida de libido. Estas categorías cubren los criterios diagnósticos de depresión de la DSM-IV, y la puntuación total, que va de 0 a 63 puntos, se divide en 4 niveles: ausente o mínima (0-13), leve (14-19), moderada (20-28) o grave (29-63).

INVENTARIO DE ANSIEDAD DE BECK-BAI

El inventario de ansiedad de Beck es una herramienta breve, que consta de 21 ítems que exploran los síntomas somáticos de la ansiedad. Los pacientes indican cuánto les ha molestado cada uno de los síntomas en la última semana. Las respuestas van desde 0 (nada) a 3 (severamente). La puntuación final es la suma de la puntuación de cada uno de los ítems, que va desde 0 a 63. Se recomienda la siguiente interpretación: 0-9 no ansiedad, 10-18 ansiedad leve-moderada, 19-29 ansiedad moderada-severa, 30-63 ansiedad severa. Este inventario ha demostrado adecuada validez, fiabilidad y capacidad para detectar el cambio (174).

Etapas experimentales.

Determinación de CGRP, VIP y PACAP.

Los pacientes de estudio fueron citados en la consulta de cefaleas para la extracción de muestras de 5 ml de sangre de la vena cubital en condiciones de ayunas. Los pacientes debían encontrarse en un periodo libre de migraña desde al menos 72 h antes. Las muestras fueron recogidas en tubos BD Vacutainer® sin anticoagulante (Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, New Jersey, USA), centrifugadas a temperatura ambiente y 3.500 revoluciones en menos de 10 minutos desde su extracción, posteriormente alicuotadas y almacenadas en congelador a -80 °C hasta su uso. El análisis de dichas muestras se realizó mediante kits de ELISA competitivos comercialmente disponibles: BlueGene Biotech Co kit (Pudong New District, Shanghai) para PACAP y Cloud-Clone Corp kit (Wuhan, China)

para CGRP y VIP, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los rangos de detección de los kits fueron 12,35-1.000 pg/ml para CGRP, 6,17-500 pg/ml para VIP y 0-1.000 pg/ml para PACAP.

Análisis de la metilación del ADN.

Para el análisis de la metilación del ADN se realizó una PCR cuantitativa específica para metilación a tiempo real (MsPCRQ-RT), según el procedimiento descrito por Herman et al. (175), y mediante el cual analizamos el nivel de metilación en determinadas islas CpG (descritas en la Tabla 11). A continuación, describimos el procedimiento realizado de forma detallada.

1. Muestras

Las muestras para el análisis de la metilación del ADN fueron extraídas en tubos vacutainer con EDTA mediante punción de la vena antecubital en condiciones de ayunas.

2. Aislamiento del ADN

El ADN fue aislado a partir del tubo vacutainer con EDTA usando el kit REALPURE "SSS" Kit (Durviz SL, Valencia, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y almacenado en nevera a -20°C hasta su uso.

3. Conversión con bisulfito.

En primer lugar, la concentración de ADN se cuantificó usando el espectrofotómetro Nanovue Plus de GE HealthCare.

Tras la cuantificación, se realizó una conversión con bisulfito, procedimiento que modifica las citosinas (C) no metiladas a uracilo (U), mientras que no afecta a las C metiladas. El objetivo de esta conversión es poder diseñar cebadores específicos que distingan las regiones metiladas de aquellas no metiladas, de forma que las C no metiladas que se han convertido a U, serán timina (T) en la hebra complementaria (cebador), y las C metiladas no convertidas, serán guanina (G) en la hebra complementaria. La conversión con bisulfito se realizó con EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante.

4. Cebadores

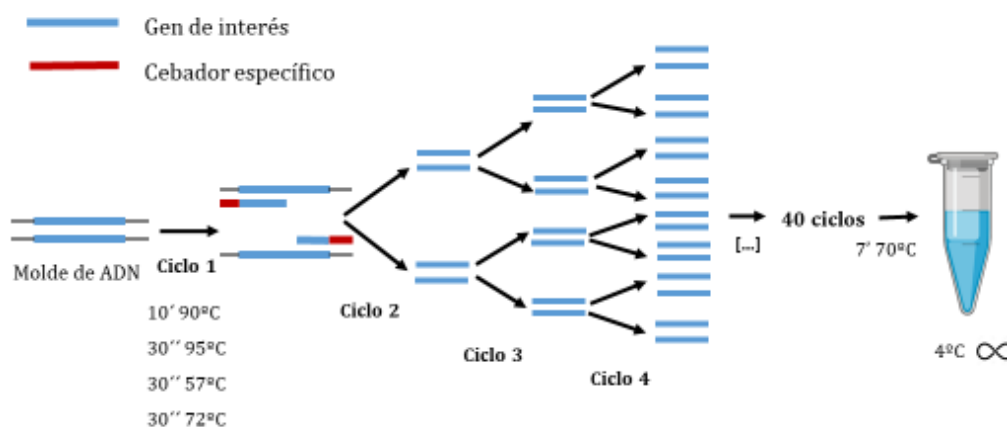
Para diseñar los cebadores específicos, se seleccionaron las islas CpG con la herramienta **EMBOSS** **CpG** **plot** (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) usando la secuencia del gen obtenida por NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Para estas islas CpG, se diseñaron los cebadores específicos con la herramienta **MethPrimer** (<https://www.urogene.org/methprimer/>) (176).

5. MsPCRQ-RT.

Posteriormente se realizó una amplificación mediante PCRq con TB Green™ Premix Ex Taq™ II (TaKaRa Bio Inc, Japón), utilizando una muestra de ADN de 5ng. En cada placa de MsPCRQ-RT se incluyó:

- Un control no metilado (0% metilado) que sirve como control negativo.
- Un control completamente metilado (100% metilado) de concentración conocida.
- Agua, que es el control negativo que nos permite comprobar que en los reactivos de la reacción no hay ninguna contaminación.
- Las muestras, que fueron analizadas por tripletes (MC, ME y CS) emparejados por sexo y edad.

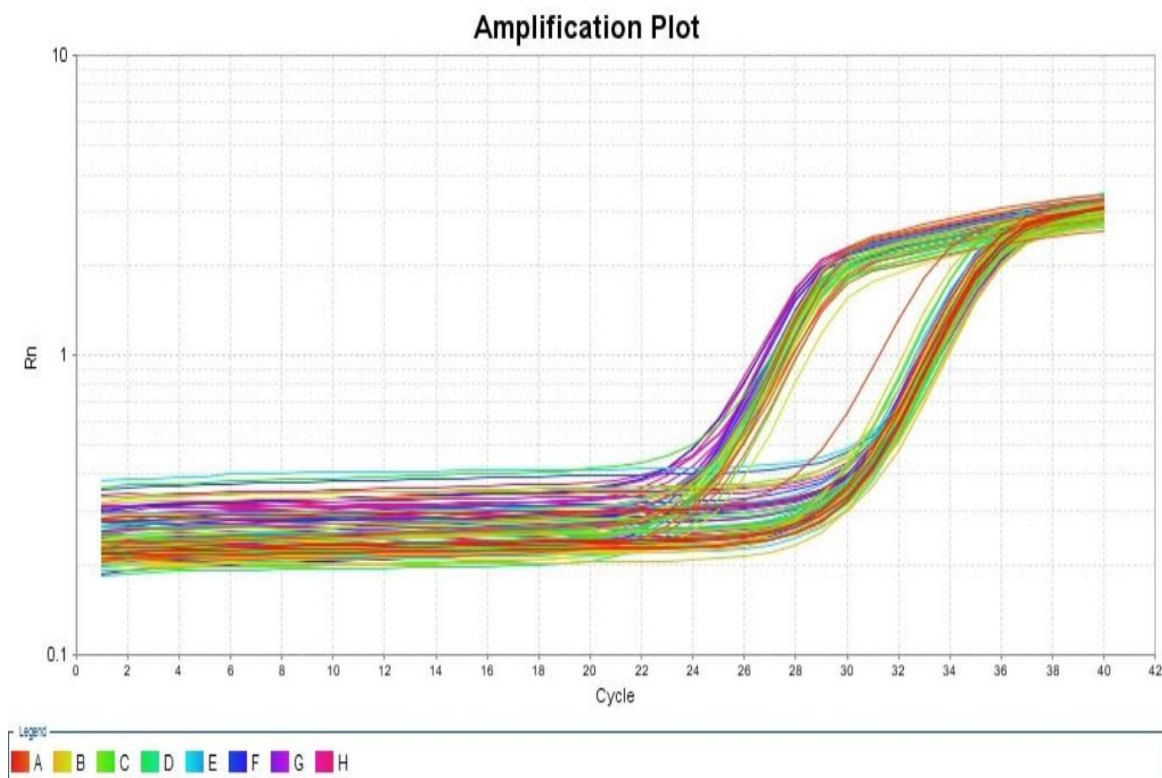
Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C, y 30 segundos a 72°C, y finalmente 7 minutos a 72°C (Figura 4). Estas reacciones se ejecutaron por duplicado en un Sistema StepOnePlus (Applied Biosystems, CA, USA).

Figura 4.- Esquema del proceso de amplificación de la PCR.

El resultado de la PCR es una curva de expresión cuyo objetivo final es el C_T (Figura 5). El valor " C_T " (del inglés, Threshold Cycle: ciclo umbral) viene marcado por el inicio de la fase exponencial e indica el número del ciclo en el que la cantidad de la muestra amplificada alcanza un umbral fijo determinado por el equipo.

Para analizar los resultados se utilizó el método $\Delta\Delta C_T$ (177,178), que sirve para calcular los cambios relativos en la expresión génica en relación a una referencia. En este caso, se utilizó como referencia la β -actina, que es una proteína altamente conservada, que se expresa por igual en todos los tipos celulares. Con este método, los resultados se presentan como el porcentaje que ha cambiado la expresión del gen con respecto a la referencia (PMR: Porcentaje de Metilación de una Referencia).

$$\Delta\Delta C_T = \text{muestra de ADN } (C_{T \text{ gen } x} - C_{T \beta\text{-actina}}) - \text{ADN 100\% metilado } (C_{T \text{ gen } x} - C_{T \beta\text{-actina}})$$

Figura 5.- Ejemplo de la curva de expresión como resultado de la PCR.

Amplification Plot=gráfico de amplificación; Cycle=ciclo.

Análisis de la expresión de ARNm

1. Muestras de ARN

Las muestras de sangre periférica para el análisis de expresión de ARNm se recolectaron en tubos Tempus[™] Blood RNA (Applied Biosystem, CA, EE. UU.) para su estabilización y se almacenaron a 4 °C hasta el aislamiento del ARN (proceso que se tiene que realizar en menos de 2 días tras su almacenamiento).

2. Aislamiento del ARN

El ARN total se aisló de los tubos Tempus[™] con el kit Tempus[™] Spin RNA Isolation (Applied Biosystem, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se midieron mediante cuantificación espectroscópica utilizando un espectrofotómetro Nanovue Plus (GE Healthcare, Connecticut, EE. UU.) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3. Síntesis de ADN copia (ADNc).

La hebra de ADNc se transcribió de forma inversa a partir de 500 ng de ARN utilizando el kit de reactivos PrimeScript RT (TaKara Bio Inc, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante, que genera ADNc a partir de ARN para la PCR en tiempo real. Este ADNc resultante se almacenó a -20°C hasta su análisis.

4. Expresión ARNm.

Se realizó una PCR en tiempo real para examinar la expresión de ARNm de *MTDH/AEG1* y TBP (del inglés, TATA-box binding protein; proteína que se expresa de una manera constante en todos los tipos celulares y que se utilizó como control interno), mediante el método TaqMan (Applied Biosystem, CA, EE. UU.). Se usaron sondas TaqMan para *MTDH/AEG1* (Hs_00757841_m1) y TBP (Hs_00427620_m1), y Premix Ex Taq DNA polimerasa para PCR en tiempo real (TaKara Bio Inc, Japón). Las concentraciones de la muestra y los volúmenes de los reactivos se agregaron según las instrucciones del fabricante en un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, EE. UU.). Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y anillamiento a 60°C durante 1 minuto. Las muestras de ADNc se midieron por duplicado. Se usaron dos pocillos con blancos de agua como controles negativos y se usó TBP como patrón interno. Los niveles relativos de ARNm se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Análisis estadístico.

Los datos se recogieron en bases de datos Access y Excell. Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SPSS (IBM Corp., v.21.0. Armonk, New York, USA).

Análisis descriptivo

En el análisis descriptivo, las variables cualitativas se expresaron como frecuencia absoluta (n) y relativa (en porcentaje, %). La distribución de las variables cuantitativas se comparó con la curva de distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, se describieron con una medida de tendencia central y una de dispersión: media $\pm$ desviación estándar (DE) en el caso de variables con distribución normal, o mediana y límites, si la distribución no sigue la normalidad.

Estadística inferencial

Para todos los estadísticos se asumió un error $\alpha=0,05$; una $p<0,05$ bilateral se definió como estadísticamente significativo. En comparaciones múltiples, los valores de p se corrigieron por el método de Bonferroni.

Análisis univariado

Se compararon las variables entre los distintos grupos clínicos. Las variables cualitativas se compararon utilizando el método Chi² o el test exacto de Fisher según las características de la muestra. Las diferencias entre las variables cuantitativas se analizaron con la prueba *T*-test para muestras independientes, en caso de distribución normal, o *U* de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para las variables de distribución no normal, según el número de muestras a comparar.

Análisis bivariado

Se investigó la relación entre las variables mediante el test “*r*” de Pearson para aquellas con distribución normal, o el test “*rho*” de Spearman para las variables con distribución no normal.

Regresión logística

Se realizaron modelos de regresión logística para investigar la asociación entre los niveles de metilación de los genes y el fenotipo de la migraña. Para ello se emplearon los niveles de metilación de los genes como variables independientes, y la categoría diagnóstica como variable dependiente policotómica.

Para evaluar el efecto del nivel de la metilación de los genes individualmente sobre la categoría diagnóstica, se realizó un modelo de regresión lineal general.

Se realizó un modelo de regresión logística multivariable, añadiendo como covariables el nivel de metilación de los genes mediante un sistema de selección de variables “hacia delante” (según valor de $p < 0,05$), ajustado por los factores de confusión sexo y edad, y en algunos casos, por otras variables como la MCA, para investigar su efecto sobre el diagnóstico clínico. Se analizó además la multicolinealidad entre las covariables.

Las estimaciones de regresión se dieron como coeficientes de regresión (β), u odds ratio (OR) según el modelo, e intervalo de confianza (IC) del 95%.

Análisis de sensibilidad y especificidad. Curvas ROC.

Para estudiar el valor diagnóstico de los niveles de metilación de *MTDH/AEG1* para la MC, se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad para distintos puntos de corte. La mejor combinación de valores de sensibilidad-especificidad para un valor de corte concreto se determinó por el índice *J* de Youden ($J = \text{sensibilidad} + \text{especificidad} - 1$). La desviación de los valores observados frente a los esperados se representó en curvas ROC, y se calculó el área bajo la curva (ABC) y su significación respecto a una distribución asintótica.

Cálculo del tamaño muestral.

No se realizó un cálculo del tamaño de la muestra previo a la realización del estudio dada la ausencia de estudios previos utilizando la misma metodología.

5. RESULTADOS

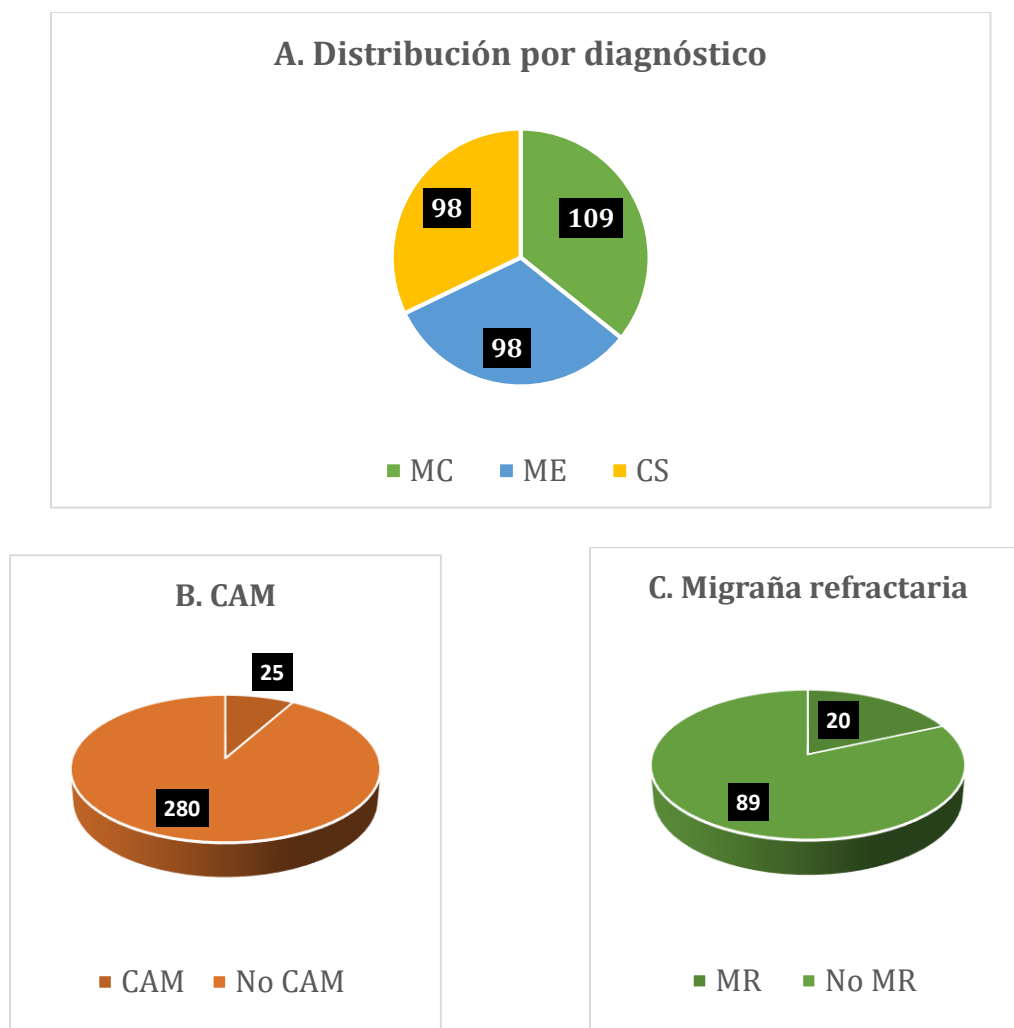
5.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Del total de la base de datos de la Unidad de cefaleas del HUMV, procedente de dos consultas monográficas del Servicio de Neurología de este hospital y una consulta de atención primaria del centro de salud Camargo Costa, reclutada entre 2015 y 2019 y compuesta por 545 pacientes con migraña y 390 controles sanos, se llevó a cabo un proceso de emparejamiento por edad y sexo, obteniendo una muestra total para el estudio de 305 individuos, de los cuales 274 (89,3%) eran mujeres (Figura 6). De ellos, 109 eran migrañosos crónicos (MC), 98 migrañosos episódicos (ME) y 98 controles sanos (CS) (Figura 7A). Un 18% (20/109) de los pacientes con MC cumplían criterios de migraña refractaria (MR) (Figura 7B). Del total de la muestra, 25 pacientes (22 MC y 3 ME) cumplían criterios de CAM (Figura 7C).

Figura 6.- Distribución por sexos de la muestra.



Figura 7.- Distribución de los principales diagnósticos (A. MC, ME y CS; B. MR; C.MC con CAM)



Se obtuvieron muestras de sangre periférica para los análisis de laboratorio de todos los participantes en el estudio (N=305). Sin embargo, para los análisis de metilación del ADN en los genes implicados en la fisiopatología de la migraña y en la respuesta al estrés, objetivos primarios de esta tesis, contamos sólo con las muestras de 296 participantes, dado que algunas de ellas (N=9) no dieron resultados tras la realización de la RT-MsQPCR, bien porque la concentración de ADN fue insuficiente o bien por algún problema técnico durante su procesamiento. Las características demográficas y clínicas de esta muestra de 296 individuos se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12.- Características demográficas y clínicas de la muestra.

	MC N=101	ME N=98	CS N=97	P
Mujeres n (%)	89/101 (89,9)	89/98 (90,8)	88/97 (90,8)	0,773
Edad *	41 ± 10	41 ± 10	41 ± 10	0,998
Edad de inicio *	15 ± 9	19 ± 10	N/A	0,038[†]
IMC *	25,49 ± 5,1	25,16 ± 4,3	25,30 ± 4,8	0,768
HIT-6 *	61,86 ± 13,0	58,44 ± 8,9	N/A	0,105 [†]
MIDAS *	68,79 ± 65,79	17,17 ± 26,5	N/A	<0,001[†]
Días con cefalea/90 días *	48 ± 2	17 ± 22	N/A	<0,001[†]
MCA n (%)	26/101 (26)	22/98 (22)	N/A	0,743 [†]
CAM n (%)	20/101 (19,8)	3/98 (3,1)	N/A	<0,001[†]
MR n (%)	19/101 (18,8)	1/98 (1,02)	N/A	<0,001[†]
CTT n (%)	34/101 (33,7)	22/98 (22,4)	0/97 (0%)	0,079 [†]
Hipertension n (%)	8/101 (7,9)	4/98 (4,08)	2/97 (2,06)	0,315
Hiperlipidemia n (%)	10/101 (9,9)	12/98 (12,2)	14/97 (14,4)	0,621
Cardiopatía isquémica n (%)	0/101 (0)	1/98 (1)	0/97 (0)	0,99
Tabaquismo n (%)	25/101 (24,7)	23/98 (24,5)	26/97 (26,8)	0,845
Alcohol n (%)	27/101 (26,7)	19/98 (19,4)	15/97 (15,5)	0,145
Anticonceptivos n (%)	8/101 (7,9)	24/98 (24,5)	20/97 (20,6)	0,001
Fibromialgia	5/101 (4,9)	3/98 (3,06)	0/97 (0)	<0,001
Alodinia	51/101 (50,5)	18/98 (18,4)	N/A	<0,001[†]

* Media ± DE.

† Comparación entre MC y ME.

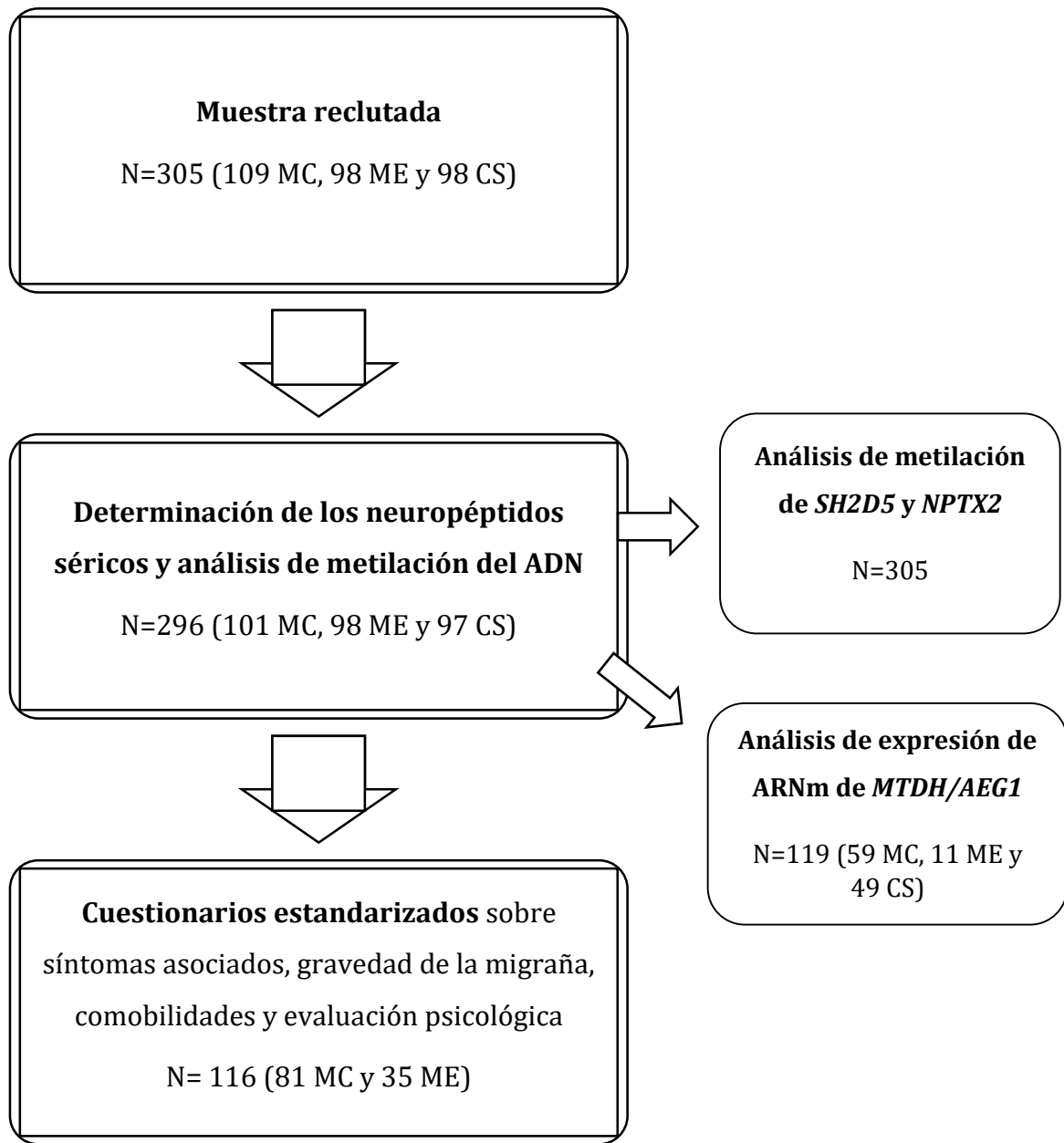
Se resaltan en negrita las diferencias estadísticamente significativas.

MC: migraña crónica; ME: migraña episódica; CS: controles sanos; IMC: Índice de masa corporal; HIT-6: Headache Impact Test; MIDAS: Migraine Impact Disability Score; MCA: migraña con aura; CAM: cefalea por abuso de medicación; MR: Migraña refractaria; CTT: Cefalea tensional.

Como se puede observar en la tabla 12, los grupos fueron homogéneos en cuanto a la media de edad y la distribución por sexos. Los pacientes con MC tenían una edad de inicio de la migraña más precoz que los pacientes con ME ($p=0,038$). No hubo diferencias en cuanto al IMC, la frecuencia de migraña con aura (MCA), la coexistencia de cefalea tensional o la presencia de factores de riesgo cardiovascular, entre los diferentes grupos clínicos. Sólo hubo diferencias significativas en la puntuación de la escala MIDAS, el número de días de cefalea en los últimos 90 días, el diagnóstico concomitante de cefalea por abuso de medicación (CAM), el uso de anticonceptivos orales y la coexistencia de fibromialgia y alodinia, que fue superior en todos los casos en el grupo MC, excepto el uso de anticonceptivos orales que fue más frecuente en la ME.

Del total de pacientes con migraña ($N=199$), en el momento del reclutamiento y obtención de las muestras, 81 (40,7%) tenían algún tratamiento preventivo, de los cuales 69 eran pacientes con MC y 12 con ME. 42 de los pacientes con MC recibían tratamiento con OnaBT, y el resto tomaban tratamientos preventivos orales.

Del total de la muestra, sólo 116 (58,3%) de los casos (81 MC y 35 ME), participaron en el análisis del TEPT y los ETs, respondiendo a las escalas y cuestionarios estandarizados sobre síntomas asociados a la migraña, gravedad de la misma, comorbilidades y evaluación psicológica. El resto de los pacientes no acudieron a la consulta para la administración de los mismos o los respondieron de forma incompleta (Figura 8. Flujograma de pacientes).

Figura 8.- Flujograma de pacientes.

5.2 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE CGRP, VIP Y PACAP

Para el análisis de los neuropéptidos séricos contamos con muestras de 296 individuos, de los cuales 266 (89,9%) fueron mujeres. De ellos, 101 tenían MC, 98 ME y 97 fueron CS, con una media de edad de 41 ± 10 años. Un total de 48 pacientes tenían MCA (26 MC y 22 ME). Un total de 81 pacientes estaban con tratamiento preventivo (69 MC y 12 ME), 42 de ellos con OnaBT.

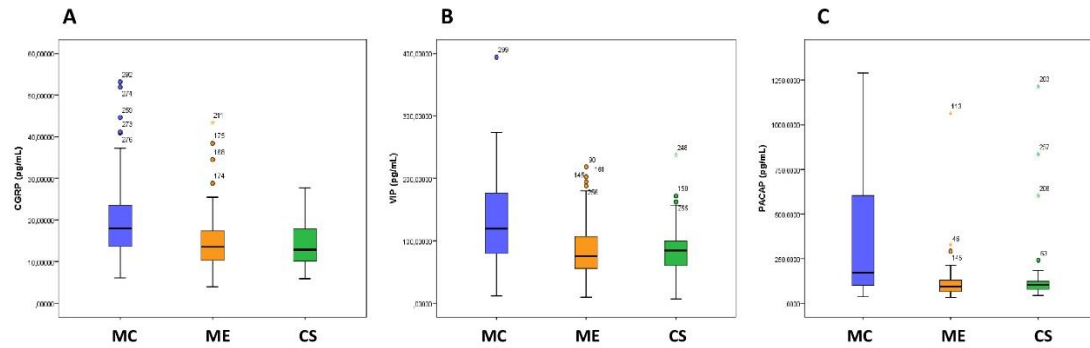
Encontramos que los niveles interictales de CGRP, VIP y PACAP, fueron significativamente superiores en MC vs ME y vs CS (Tabla 13, Figura 9). No hubo diferencias en los niveles de ninguno de los neuropéptidos entre pacientes con ME y CS. Observamos que la variabilidad intracategoría fue mayor en los pacientes con MC que en los pacientes con ME y que en los CS (Figura 9).

La migraña con aura, la HTA, la DM, el consumo de alcohol o tabaco, la dislipemia o el antecedente de cardiopatía isquémica, no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de los neuropéptidos.

Tabla 13.- Comparación de las concentraciones séricas de CGRP, VIP y PACAP entre las diferentes categorías clínicas.

	MC N=101	ME N=98	CS N=97	P*
CGRP, pg/ml	18,02 (14,4-24,7)	14,66 (10,29-15,45)	13,99 (10,09- 17,87)	<0,001
VIP, pg/ml	121,73 (48,72- 186,72)	75,60 (28,72- 107,10)	84,68 (35,32- 99,79)	<0,001
PACAP, pg/ml	204,93 (101,08- 597,64)	94,99 (65,77-128,48)	103,14 (59,42- 123,97)	<0,001
Resultados presentados según mediana y límites. * Kruskal-Wallis. Resaltadas en negrita, las diferencias estadísticamente significativas.				

Figura 9.- Diagramas de cajas que muestran los niveles séricos basales de CGRP, VIP y PACAP en la diferentes categorías diagnósticas.



* En A, B y C, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos MC y ME ($p < 0,001$), y MC y CS ($p < 0,001$), pero no existen diferencias entre el grupo ME y CS.

5.3 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN

Para facilitar la redacción de los resultados de los análisis de la metilación del ADN, hablaremos de forma simplificada del nivel de metilación de determinado gen, aunque nos estamos refiriendo al PMR (Porcentaje de Metilación de una Referencia) en determinada isla CpG relacionada con dicho gen, según la metodología empleada y descrita en Material y Métodos. Esto tendrá su implicación para la interpretación de los resultados como se discutirá en el apartado correspondiente.

Genes asociados a la migraña en los GWAS.

Para los análisis de la metilación de los genes implicados en la fisiopatología de la migraña, dispusimos de muestras de 296 de los participantes. Sus características clínicas se resumen en la Tabla 12.

1. Análisis univariado

El nivel de metilación de los genes candidatos (*ADAR β 2*, *MTDH/AEG1*, *MEF2D*, *PRDM16*, *TGF β 1*, *TGR β R2*, *TRPV1*, *ZNF555*) se comparó entre los distintos grupos clínicos (101 MC, 98 ME y 97 CS) y se encontraron diferencias significativas en dos de los genes a estudio (Tabla 14).

Por un parte, el nivel de metilación del gen *MTDH/AEG1* mostró diferencias significativas entre las categorías clínicas (PMR 14,420 (13,56-15,38) en MC vs 13,725 (13,09-14,70) en ME vs 14,020 (13,13-14,93) en CS, $p= 0,007$) (Tabla 14, Figura 10).

Por otra parte, también se encontraron diferencias significativas en el nivel de metilación del gen *ZNF555* (PMR 17,73 (16,05-19,465) en MC vs 18,30 (17,32-21,04) en ME vs 17,83 (17,02-20,12) en CS; $p= 0,028$). Sin embargo, este resultado no fue significativo tras la corrección por comparaciones múltiples de Bonferroni (Tabla 14).

No se encontraron diferencias en los niveles de metilación del resto de genes a estudio entre los grupos clínicos (Tabla 14).

Tabla 14.- Comparación entre los niveles de metilación de los genes asociados a la migraña en los GWAS en los diferentes grupos clínicos.

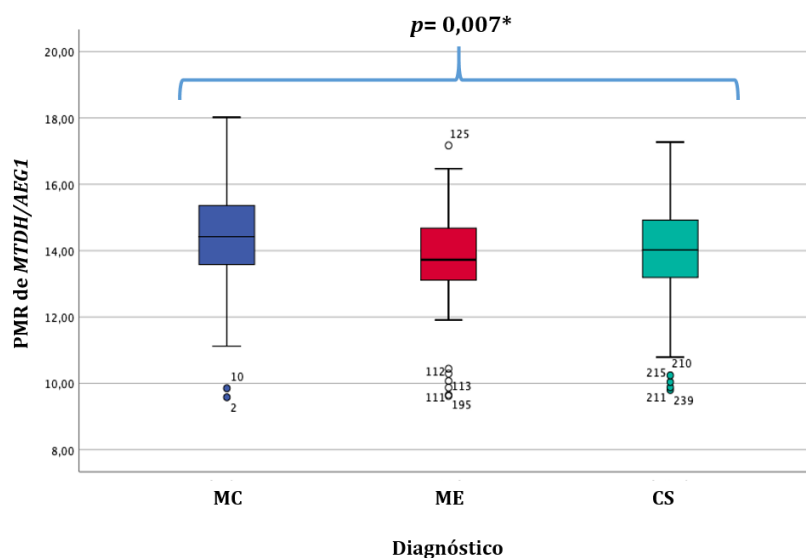
Gen	MC N=101	ME N=98	CS N=97	<i>p</i> *
<i>ADARβ2</i>	11,720 (10,08-13,13)	12,095 (10,64-12,84)	11,860 (10,57-12,94)	0,708
<i>MTDH/ AEG1</i>	14,420 (13,56-15,38)	13,725 (13,09-14,70)	14,020 (13,13-14,93)	0,007
<i>MEF2D</i>	14,410 (13,37-16,09)	14,740 (13,91-15,62)	14,440 (13,61-15,73)	0,370
<i>PRDM16</i>	14,46 (13,04-15,95)	14,61 (13,77-15,25)	14,23 (13,31-15,35)	0,462
<i>TGFβ1</i>	14,4 (11,53-15,73)	14,53 (11,95-16,27)	14,05 (11,57-11,57)	0,367
<i>TGFβR2</i>	14,42 (13,45-15,7800)	15,12 (13,88-15,94)	14,83 (13,39-15,77)	0,307
<i>TRPV1</i>	11,82 (10,85-13,74)	11,935 (10,99-13,3375)	11,99 (10,99-13,77)	0,835
<i>ZNF555</i>	17,73 (16,05-19,465)	18,30 (17,32-21,04)	17,83 (17,02-20,12)	0,028**

Resultados expresados según mediana y límites del PMR: Porcentaje de metilación de una referencia (método $\Delta\Delta Ct$).

* Test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

** No significativo tras corrección de Bonferroni.

Figura 10.- Diagrama de cajas que muestra el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* en los diferentes grupos clínicos.



*Kruskal-Wallis.

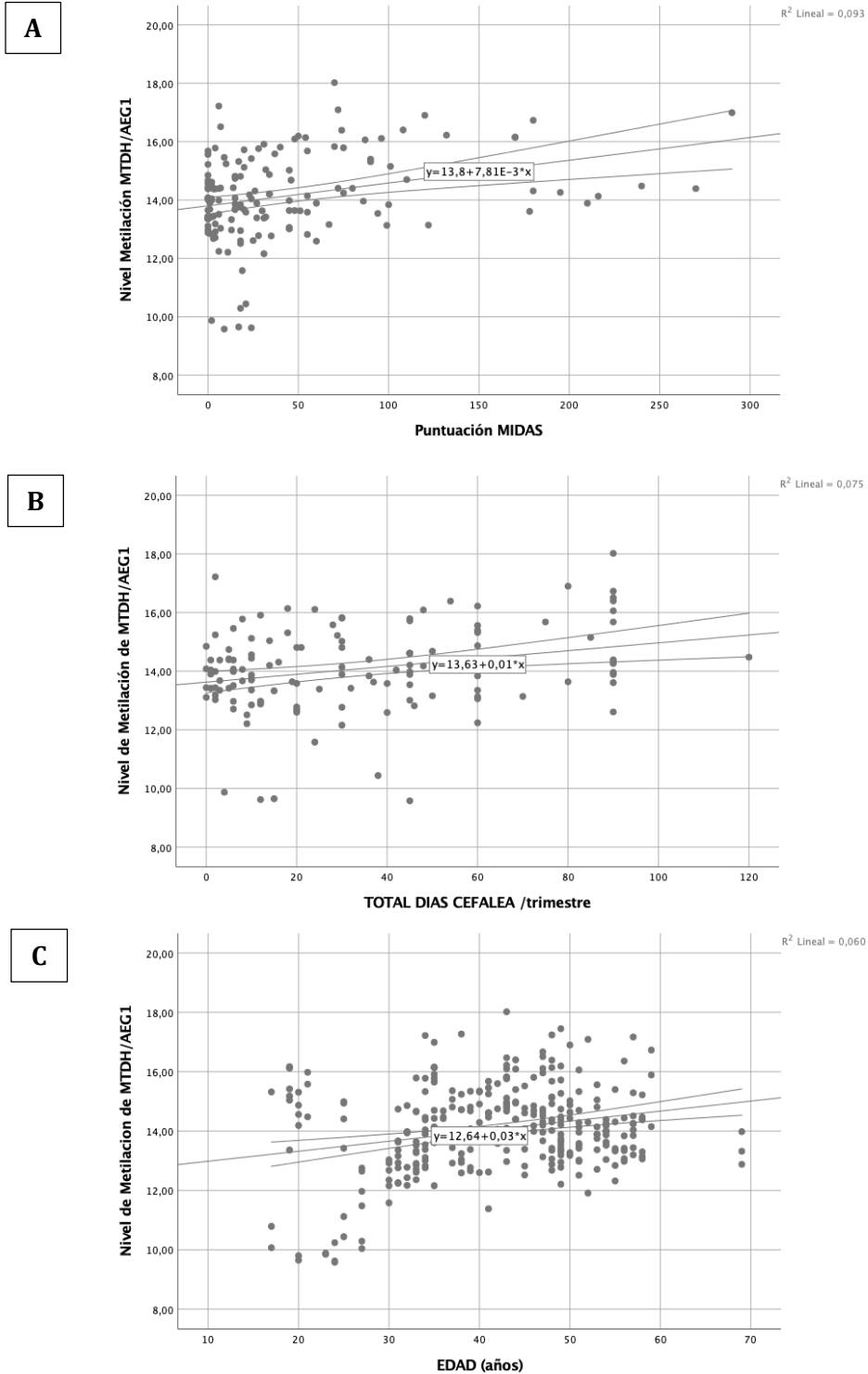
Aunque la diferencia en los niveles de metilación de *MTDH/AEG1* entre los distintos grupos fue estadísticamente significativa, observamos que las diferencias absolutas entre las medianas de los PMR fueron pequeñas (Tabla 14).

2. Análisis bivariado

Se investigó la correlación entre el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* y variables clínicas, demográficas y biomarcadores bioquímicos.

Se observó que el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* mostró una correlación positiva débil con variables clínicas como la puntuación en la escala MIDAS ($\rho = 0,264$, $p = 0,002$), el número de días de cefalea/90 días ($\rho = 0,197$, $p = 0,027$) y la edad ($\rho = 0,174$, $p = 0,014$) (Figura 11). Se observó también una correlación con los niveles de VIP ($\rho = 0,198$; $p = 0,005$) y PACAP ($\rho = 0,264$; $p = 0,014$).

Figura 11. – Nubes de puntos que muestran la correlación entre el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* y la puntuación en la escala MIDAS (A), el número de días de cefalea/90 días (B) y la edad (C).



3. Regresión logística

Para analizar la relación entre el nivel de metilación de los genes y el diagnóstico clínico, se realizaron modelos de regresión logística introduciendo la categoría clínica como variable dependiente, y el nivel de metilación de los genes como variables independientes.

En el modelo de regresión lineal general, para evaluar la influencia del nivel de metilación de los genes individualmente sobre la categoría diagnóstica (MC o ME), se observó que sólo el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* se asocia de forma significativa con el diagnóstico de MC, incrementando el riesgo de la misma *versus* CS pareados por edad y sexo, con una OR 1,268 (IC 95% 1,04-1,6; $p=0,020$). En este modelo, el nivel de metilación de ninguno de los genes estudiados incrementó el riesgo de ME vs CS (Tabla 15. Análisis univariado).

Dado que la propia edad y el sexo podrían influir sobre los niveles de metilación de los genes, se ajustó el modelo por estas dos variables, seleccionando aquellas otras variables con valor de $p<0,05$. Tras ello, se observó que la asociación entre la metilación de *MTDH/AEG1* y el diagnóstico de MC vs CS se mantuvo, con una OR 1,350 (IC 95% 1,1-1,7; p ajustada=0,008). En este modelo, aparecieron, además, otros efectos significativos, de manera que la metilación de *ZNF555* disminuyó el riesgo de MC vs CS (OR 0,908 (IC 95% 0,8-0,99); $p=0,028$), y la metilación de *TGF β 1* aumentó el riesgo de ME vs CS (OR 1,131 (1,0-1,3); $p=0,044$) (Tabla 15, Modelo 1).

Al ajustar este mismo modelo por MCA, que confiere mayor especificidad al diagnóstico de la MC, y que podría tener una susceptibilidad genética diferente, se observó que la metilación de *MTDH/AEG1* incrementó también el riesgo de MC *versus* ME (OR= 1,675; IC 95%= 1,3-2,1, $p<4,0E-5$). En este modelo, la metilación de *TGF β 1* (OR= 0,829, 95% IC= 0,7-0,9, $p= 0,005$), así como de *ZNF555* (OR= 0,862, 95% IC= 0,8-0,9, $p= 0,001$) disminuyeron el riesgo de MC *versus* ME (Tabla 15, Modelo 2).

Los factores de riesgo cardiovascular se descartaron como covariables de ajuste al no haber mostrado efecto sobre los niveles séricos de los neuropéptidos CGRP, VIP y PACAP.

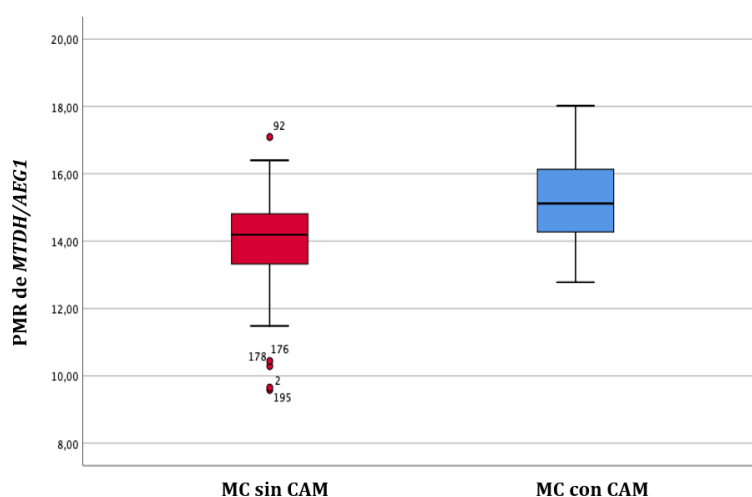
Tabla 15.- Modelos de regresión logística para analizar el riesgo de MC o ME según el nivel de metilación de los genes asociados a la migraña en los GWAS.

Análisis univariado*				
Gen	MC	P	ME	P
<i>ADARβ2</i>	0,996 (0,9-1,1)	0,943	1,026 (0,9-1,1)	0,641
<i>MTDH/AEG1</i>	1,268 (1,04-1,6)	0,020	0,924 (0,8-1,1)	0,412
<i>MEF2D</i>	0,981 (0,9-1,1)	0,698	1,032 (0,9-1,1)	0,491
<i>PRDM16</i>	1,002 (0,9-1,1)	0,964	1,035 (0,9-1,1)	0,434
<i>TGFβ1</i>	1,012 (0,9-1,1)	0,824	1,085 (0,9-1,2)	0,140
<i>TGFβR2</i>	0,978 (0,9-1,1)	0,637	1,035 (0,9-1,1)	0,433
<i>TRPV1</i>	0,991 (0,9-1,1)	0,890	0,980 (0,9-1,1)	0,755
<i>ZNF555</i>	0,925 (0,9-1,0)	0,072	1,026 (0,9-1,1)	0,506
Modelo 1 (ajustado por sexo y edad)**				
Gen	MC	P	ME	P
<i>MTDH/AEG1</i>	1,350 (1,1-1,7)	0,008	0,816 (0,7-1,0)	0,072
<i>TGFβ1</i>	0,951 (0,8-1,1)	0,417	1,131 (1,0-1,3)	0,044
<i>ZNF555</i>	0,908 (0,8-0,99)	0,028	1,043 (0,9-1,1)	0,302
Modelo 2 (ajustado for MCA)***				
Gen	MC	P		
<i>MTDH/AEG1</i>	1,675 (1,3-2,1)	4,0E-5		
<i>TGFβ1</i>	0,829 (0,7-0,9)	0,005		
<i>ZNF555</i>	0,862 (0,8-0,9)	0,001		
Los riesgos se expresan según OR e IC 95%. Diagnóstico clínico como variable dependiente y nivel de metilación de los genes como variables independientes. *Análisis univariado utilizando la categoría CS como referencia. **Modelo multivariante ajustado por sexo y edad, seleccionando las variables “hacia delante” según valor de $p < 0,05$. ***Mismo modelo, ajustado, además, por MCA, utilizando ME como referencia.				

Cefalea por abuso de medicación

En los pacientes con MC se realizó un análisis estratificado *post-hoc* para investigar el efecto de la metilación de *MTDH/AEG1* sobre el riesgo de CAM. Se observó que el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* fue mayor en pacientes con MC y CAM que en pacientes con MC sin CAM [mediana 15,1 y límites 12,8-18,0, vs 14,4 (9,6-17,0); *U* de Mann-Whitney $p=0,012$] (figura 12).

Figura 12.- Diagrama de cajas que muestra el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* en los pacientes con MC según CAM o no.



En el modelo de regresión logística ajustado por sexo y edad, observamos que la metilación de *MTDH/AEG1* aumentó el riesgo de MC con CAM *versus* MC sin CAM, casi duplicando la probabilidad de su diagnóstico (OR= 1,708; 95% IC= 1,1-2,6; $p= 0,010$) (Tabla 16).

Tabla 16.- Riesgo de MC con CAM según el nivel de metilación de *MTDH/AEG1*.

Gen	MC con CAM OR e IC 95%	<i>p</i>
<i>MTDH/AEG1</i>	1,708 (1,1-2,6)	0,010
Modelo ajustado por sexo y edad. MC sin CAM como categoría de referencia.		

Tratamiento preventivo

Por último, al estratificar a los pacientes según su tratamiento preventivo, encontramos también una metilación diferencial de *MTDH/AEG1*, de manera que una menor metilación de este gen se asoció, en pacientes con MC, con ausencia de tratamiento preventivo *versus* aquellos que recibían OnaBT (OR= 0,668; IC 95%= 0,48-0,93, $p= 0,017$). Además, aquellos pacientes con ME sin tratamiento preventivo, tenían niveles de metilación de *MTDH/AEG1* inferiores que aquellos que estaban con tratamiento preventivo oral (OR= 0,586; IC 95% = 0,35-0,98, $p= 0,041$).

4. Análisis de la covarianza en el modelo de regresión logística

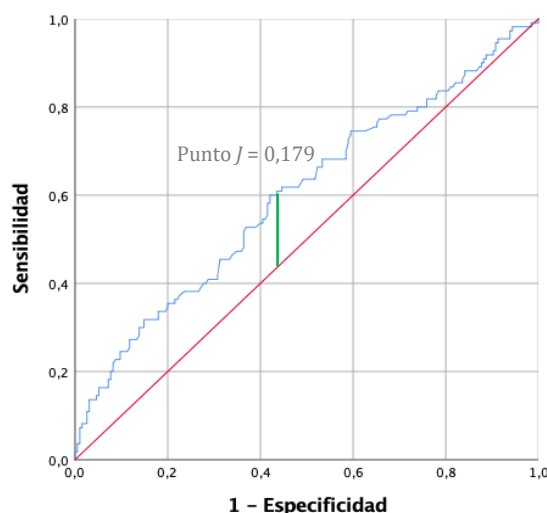
Se realizó un análisis de la covarianza entre los genes estudiados, de manera que, utilizando el modelo de regresión lineal con el grado de metilación de *MTDH/AEG1* como variable dependiente, y el grado de metilación de los genes analizados como variables independientes, detectamos que *ADAR β 2* ($\beta= 0,187$, IC 95% = 0,11 - 0,27, $p<0,001$) y *TGF β 1* ($\beta=0,141$, IC 95% = 0,06 - 0,22) modificaron el grado de metilación de *MTDH/AEG1*. Aunque se encontró alguna correlación entre estos genes, el factor de inflación de la varianza de *ADAR β 2* y *TGF β 1* fue bajo (VIF = 1,221) y la tolerancia fue alta (T = 0,819) con el gen *MTDH/AEG1*, lo que demuestra que el grado de colinealidad fue bajo.

5. Curvas ROC

Se estudió el valor diagnóstico del PMR de metilación de *MTDH/AEG1* para discriminar la MC frente a la ME y CS, mediante un análisis de sensibilidad y especificidad para distintos puntos de corte y se representó mediante una curva ROC (Figura 13). De esta forma el valor del PMR de *MTDH/AEG1* para el que se obtuvo una mejor combinación de valores de sensibilidad y especificidad fue 14,165, que se corresponde con una sensibilidad de 0,6 y una especificidad de 0,579 (Punto $J = 0,179$). Este PMR es capaz de discernir los pacientes con MC de los pacientes con ME o CS con una sensibilidad de 0,6 y una especificidad de 0,579.

Se obtuvo un ABC de $0,6 \pm 0,034$, con un IC 95% 0,532-0,668; $p=0,004$. Esto indica que en nuestro estudio un 60% de los pacientes con MC pueden identificarse por tener un PMR en el exón 1 de *MTDH/AEG1* de 14,165 o mayor.

Figura 13.- Curva ROC para el diagnóstico de MC vs ME y CS según el PMR de *MTDH/AEG1*.



6. Análisis de expresión de *MTDH/AEG1*

Para analizar las consecuencias de la metilación diferencial de *MTDH/AEG1* según el grupo clínico, se realizó un análisis *post-hoc* de la expresión del ARNm de este gen, en un total de 119 pacientes (59 con MC, 11 con ME y 49 CS), de los que se disponía de una muestra adicional para el análisis de ARN.

Se encontró una menor expresión relativa de ARNm de *MTDH/AEG1* en los pacientes con MC que en los CS [-3,019 veces (95% IC=-4,6-(-1,4), $p=0,001$]. También la expresión relativa de ARNm de *MTDH/AEG1* fue menor en MC que en ME, pero esta no alcanzó significación estadística [-1,228 veces (95% CI=-4,6-2,1; $p=0,802$)].

La expresión de ARNm de *MTDH/AEG1* mostró una correlación inversa con la edad ($\rho=-0,240$; $p=0,008$) pero no con el nivel de metilación de *MTDH/AEG1* ($\rho=-0,122$; $p=0,118$). Tras ajustar por la variable edad, se observó que la menor expresión de ARNm de *MTDH/AEG1* se continuaba asociando con MC *versus* CS (OR=0,827; IC 95% CI=0,7-0,9, $p=0,001$), lo que demuestra una asociación independiente de la edad.

Genes relacionados con la respuesta al estrés

Al igual que para el análisis de la metilación de los genes implicados en la fisiopatología de la migraña, para el análisis de la metilación de los genes relacionados con la respuesta al estrés, contamos con resultados de 296 individuos.

1. Análisis univariado

En la comparación de los niveles de metilación de los genes relacionados con el estrés entre los 3 grupos clínicos, sólo el PMR de *NTSR1* mostró diferencias significativas entre los pacientes con MC, ME y CS ($p=0,001$; Tabla 17).

Tabla 17.- Comparación entre los niveles de metilación de los genes relacionados con la respuesta al estrés en los diferentes grupos clínicos.

Gen	Grupo	P25	P50	P75	p^*
<i>NTSR1</i>	MC	15,41	15,99	17,105	0,001
	ME	16,0675	16,855	17,585	
	CS	15,52	16,37	17,365	
<i>GRIN2B</i>	MC	10,18	11,68	14,69	0,943
	ME	10,495	11,9	14,8875	
	CS	9,89	11,88	15,23	
<i>ESR1</i>	MC	-0,89	0,48	3,355	0,157
	ME	-0,86	0,15	1,5975	
	CS	-1,345	-0,14	1,715	
<i>CRF</i>	MC	6,655	8,06	9,195	0,127
	ME	6,3075	7,72	8,855	
	CS	6,235	7,3	8,855	
<i>BDNF</i>	MC	11,44	14,03	15,805	0,673
	ME	11,83	14,11	17,225	
	CS	11,63	13,65	16,455	
<i>SLC6A4</i>	MC	13,18	14,44	16,08	0,459
	ME	13,0475	14,9	16,8525	
	CS	12,4	14,68	16,95	
<i>POMC</i>	MC	12,19	13,5	15,57	0,353
	ME	12,6575	13,72	15,415	
	CS	12,115	13,33	15,47	
<i>GRM1</i>	MC	11,87	13,12	15,645	0,511
	ME	12,0125	13,37	16,145	
	CS	11,635	13,07	15,66	
<i>NR3C1</i>	MC	14,135	16,29	18,015	0,355
	ME	13,61	16,795	19,4025	
	CS	13,255	16,6	19,14	

P25, P50, P75: Percentiles 25, 50 y 75.

PMR: Porcentaje de metilación de una referencia (Método $\Delta\Delta Ct$).

*Prueba de Kruskal Wallis para la comparación entre 3 grupos

2. Análisis bivariado

Se investigó la relación entre el nivel de metilación de estos genes y variables clínicas, y observamos que la edad mostró una correlación negativa con el nivel de metilación de *ESR1* ($\rho=-0,158$, $p=0,043$), *POMC* ($\rho=-0,367$, $p<0,001$), *GRM1* ($\rho=-0,246$, $p<0,001$) y algo más fuerte con *NR3C1* ($\rho=-0,618$, $p=0,001$). Por el contrario, la edad se correlacionó positivamente con el nivel de metilación de *GRIN2B* ($\rho=0,374$, $p<0,001$).

3. Regresión logística

En el análisis de regresión logística multinomial (Tablas 18 y 19), introduciendo la categoría clínica como variable dependiente, y el nivel de metilación de los genes como variables independientes, observamos la aparición de otros efectos significativos. El sexo, la edad y la MCA, no tuvieron ningún efecto en este modelo.

En la comparación entre MC y ME vs CS (Tabla 18), encontramos que la metilación de *CRF* aumentó el riesgo de MC vs CS (OR 1,243; IC 95% 1,046-1,477; $p=0,014$) y que la metilación de *NTSR1* aumentó el riesgo de ME vs CS (OR 1,373; IC 95% 1,065-1,770; $p=0,014$).

Tabla 18.- Modelo de regresión logística multinomial para analizar el riesgo de MC o ME vs CS según el nivel de metilación de los genes implicados en la respuesta al estrés.

Diagnóstico		β	Desv. Error	Sig.	Exp(β)	IC 95% para Exp(β)	
						Límite inferior	Límite superior
MC	Intersección	,351	1,320	,791			
	<i>NTSR1</i>	-,212	,121	,080	,809	,638	1,026
	<i>CRF</i>	,217	,088	,014	1,243	1,046	1,477
	<i>NR3C1</i>	-,058	,053	,276	,944	,850	1,048
ME	Intersección	-2,442	1,238	,049			
	<i>NTSR1</i>	,317	,130	,014	1,373	1,065	1,770
	<i>CRF</i>	-,014	,096	,884	,986	,816	1,191
	<i>NR3C1</i>	,072	,052	,169	1,075	,970	1,191

*CS como categoría de referencia.

En la comparación entre MC y ME (Tabla 18), encontramos que la metilación de *NR3C1* (OR 0,878; IC 95% 0,788-0,979; $p=0,019$) y *NTSR1* (OR 0,623; IC 95% 0,471-0,823; $p=0,001$) disminuyeron el riesgo de MC vs ME.

Tabla 19.- Modelo de regresión logística multinomial para analizar el riesgo de MC vs ME según el nivel de metilación de los genes implicados en la respuesta al estrés.

Diagnóstico		B	Desv. Error	Sig.	Exp(B)	IC 95% para Exp(B)	
						Límite inferior	Límite superior
MC	Intersección	4,047	1,489	,007			
	<i>NTSR1</i>	-,474	,142	,001	,623	,471	,823
	<i>CRF</i>	,177	,094	,059	1,193	,993	1,434
	<i>NR3C1</i>	-,130	,055	,019	,878	,788	,979
*ME como categoría de referencia.							

Genes relacionados con la cronificación de la cefalea.

Para el análisis de la metilación de los genes cuyo nivel de metilación se ha asociado con la cronificación de la cefalea, obtuvimos resultados del total de los 305 participantes.

1. Análisis univariado

En la comparación entre los niveles de metilación de los genes *SH2D5* y *NPTX2* entre MC, ME y CS, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Tabla 20).

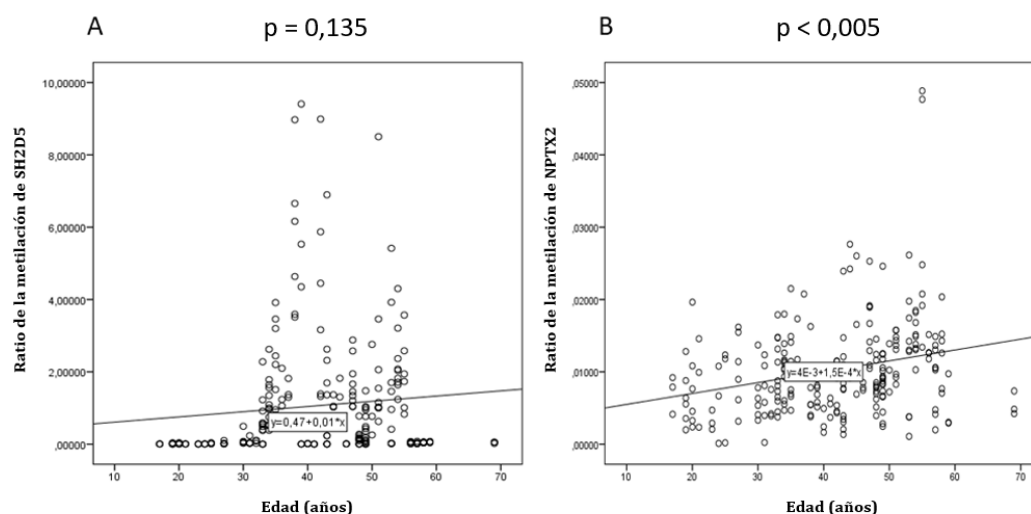
Tabla 20.- Nivel de metilación de *SH2D5* y *NPTX2* en los diferentes grupos clínicos.

Gen	MC N=109	ME N=98	CS N=98	<i>p</i> *
<i>SH2D5</i>	15,990 (14,4-19,2)	16,970 (14,9-20,8)	16,840 (14,1-20,5)	0,388
<i>NPTX2</i>	13,499 (11,8-15,3)	13,685 (12,1-14,6)	13,010 (12,0-14,3)	0,561
Mediana y límites del PMR de los genes (método $\Delta\Delta Ct$)				
*Kruskal-Wallis				

2. Análisis bivariado

Al investigar correlaciones bivariadas, encontramos que existía una correlación positiva débil entre el nivel de metilación de *NPTX2* y la edad ($r=0,266$; $p<0,005$) (Figura 10A). No existió una correlación significativa entre el nivel de metilación de *SH2D5* y la edad ($r= 0,098$; $p=0,135$) (Figura 13B).

Figura 14.- Nubes de puntos que muestran la correlación entre el nivel de metilación de la región 5' aguas arriba de *SH2D5* (A) y el exón 1 de *NPTX2* (B) con la edad.



3. Regresión logística

Para investigar la relación entre el nivel de metilación de *NPTX2* y *SH2D5* y la categoría diagnóstica, de nuevo se construyó un modelo de regresión logística multivariable. Se incluyeron los niveles de metilación de *NPTX2* y *SH2D5* y la edad como covariables, en un modelo factorial completo, con el objetivo de controlar el efecto del factor edad. Bajo este modelo, ninguna de las covariables diferenciaba el grupo clínico (Tabla 21).

Exploramos también la influencia del sexo (femenino como referencia) en el modelo. Tanto la bondad de ajuste (r de Pearson = 0,330) como el pseudo-R² (McFadden = 0,003) fueron idénticos en ambos modelos, así como en las estimaciones de los coeficientes (datos no mostrados).

Tabla 21.- Coeficientes de regresión, *odds* ratio e IC al 95%, correspondientes al modelo de regresión logística multinomial para el análisis del riesgo de MC o ME según el nivel de metilación de *SH2D5* y *NPTX2* y la edad.

Categoría clínica	B	SE	<i>p</i>	OR (IC 95%)
MC	-0,054	0,585	0,926	
<i>SH2D5</i>	0,023	0,135	0,863	1,02 (0,89-1,06)
<i>NPTX2</i>	0,465	0,952	0,625	1,59 (0,61-1,85)
Edad	0,004	0,013	0,752	1,00 (0,99-1,03)
ME	-0,041	0,588	0,945	
<i>SH2D5</i>	-0,156	0,160	0,331	0,85 (0,73-1,11)
<i>NPTX2</i>	0,108	1,048	0,918	1,16 (0,39-1,48)
Edad	0,001	0,013	0,943	1,00 (0,98-1,03)
Las variables independientes <i>SH2D5</i> , <i>NPTX2</i> y edad fueron introducidas bajo un modelo factorial completo. β: coeficiente de regresión; SE: error standard; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza.				

5.4 ANÁLISIS DEL ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y LOS EVENTOS VITALES TRAUMÁTICOS

Un total de 116 pacientes con migraña (58% de los casos), de los cuales 81 MC y 35 ME, respondieron a las escalas y cuestionarios estandarizados para la evaluación de síntomas autonómicos craneales, gravedad de la migraña, comorbilidades y evaluación psicológica.

En esta submuestra, existió también un claro predominio femenino, siendo el 91% (106/116) mujeres. No hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a la distribución por sexo (73/81 mujeres con MC vs 33/35 con ME; $p=0,463$) ni la edad (mediana de edad en MC= 44 a (36,5-51) vs 44 a (33,0-50,5) en ME; $p=0,592$) entre los grupos clínicos. Un total de 19 pacientes en el grupo MC cumplían criterios de MR (Tabla 22).

Los pacientes con MC puntuaron más alto en la escala MIDAS ($71,05 \pm 71$ en MC vs $22,71 \pm 36,2$ en ME; $p<0,001$); pero no hubo diferencias significativas en la escala HIT-6. Los pacientes con MC puntuaron más alto en las escalas de ansiedad (BAI= 18 (8-28) en MC vs 9 (5-14) en ME; $p<0,025$) y de fatiga (47 (34-60) en MC, 23 (15-48) en ME; $p<0,001$), mientras que no hubo diferencias significativas en la escala de depresión (BDI). Los pacientes con MC reconocieron tener más síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea que los pacientes con ME (5 (1,7-7,0) vs 1,5 (0-3); $p<0,001$) (Tabla 22).

Los niveles séricos interictales de CGRP, VIP y PACAP fueron superiores en los pacientes con MC vs ME ($p<0,001$ para todas las comparaciones) (Tabla 22).

Tabla 22.- Características demográficas, clínicas y comorbilidades de la submuestra de pacientes que respondieron a los cuestionarios de evaluación psicológica.

Variable	MC (n= 81)	ME (n=35)	P
Edad *	44 (36,5-51)	44 (33,0-50,5)	0,592
Sexo femenino n (%)	73/81	33/35	0,463
MR n (%)	19	0	0,001[†]
MIDAS**	71,05 ± 71,0	22,71 ± 36,2	<0,001
HIT-6**	59,17 ± 9,0	62,12 ± 13,6	0,342
BDI*	12 (7-24)	9 (5-14)	0,128
BAI*	18 (8-28)	9 (5-14)	0,025
Escala de fatiga*	47 (34-60)	23 (15-48)	<0,001
Síntomas autonómicos craneales*	5 (1,75-7,0)	1,5 (0-3,0)	<0,001
*Mediana y límites. **Mediana ± DE. † Test exacto de Fisher Abreviaturas: MC: migraña crónica, ME: migraña episódica, BDI: inventario de depresión de Beck, BAI: inventario de ansiedad de Beck, CAM: Cefalea por abuso de medicación, MR: migraña refractaria; TEPT: trastorno por estrés postraumático.			

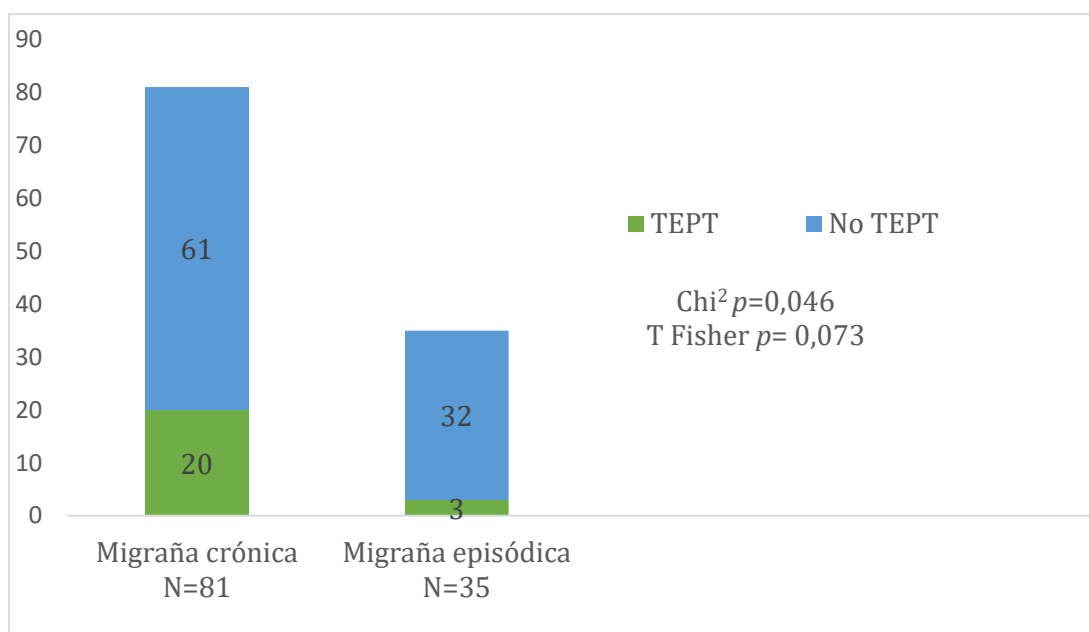
Frecuencia del TEPT y los ET

Un total de 23 pacientes de los 116 (19,8%) cumplían criterios de TEPT en el último mes, según el módulo I de la MINI Entrevista neuropsiquiátrica Internacional. De ellos, 20 (87%) sufrían MC, y 3 (13%) ME; existiendo una tendencia hacia la mayor frecuencia del TEPT en pacientes con MC (χ^2 3,995, $p=0,046$; test exacto de Fisher $p=0,073$) (Tabla 23; Figura 15).

Tabla 23.- Frecuencia del TEPT y los ETs en MC y ME.

Variable	MC (n= 81)	ME (n=35)	P
TEPT actual n (%)	20	3	0,046 0,073 [†]
Al menos 1 ET n (%)	49	26	0,350
Edad ET *	32,94 ± 15,6	31,21 ± 16,3	0,730

*Media±DE.
[†]T de Fisher. De lo contrario Chi².
 Abreviaturas: TEPT: trastorno por estrés postraumático; ET: evento traumático.
 Se realzan en negrita las diferencias estadísticamente significativas.

Figura 15.- Distribución del TEPT entre los pacientes con MC y ME.

Setenta y cinco pacientes del total (64,7%) reconocieron haber sufrido algún ET a lo largo de su vida, no existiendo diferencias entre los pacientes con MC y ME (49 MC vs 16 ME; Chi² 2,034, p=0,350). El ET más frecuente fue el fallecimiento inesperado de un ser querido, que fue informado en 53 casos (34 MC y 19 ME; p=0,222).

No se observaron diferencias significativas en el tipo ni en el número total de ET vividos por paciente entre aquellos con MC y ME (Chi² 7,806, p=0,350). Sí que hubo diferencias entre los pacientes con y sin TEPT. Los pacientes que cumplían

criterios de TEPT en el último mes habían presentado con más frecuencia la amenaza seria o daño a un miembro de la familia o amigo íntimo (6/23 vs 5/93; $p=0,008$), abusos físicos (9/23 vs 6/93; $p<0,001$) y violación (4/23 vs 3/93; $p=0,028$). Los pacientes sin TEPT refirieron con mayor frecuencia haber vivido un accidente de coche, tren o avión (20/93 vs 11/23; $p=0,011$), la muerte inesperada de un ser querido (35/93 vs 18/23; $p=0,001$) y haber estado próximos a ahogarse (10/93 vs 7/23; $p=0,025$). No hubo diferencias en la frecuencia del resto de los ET.

Migraña refractaria

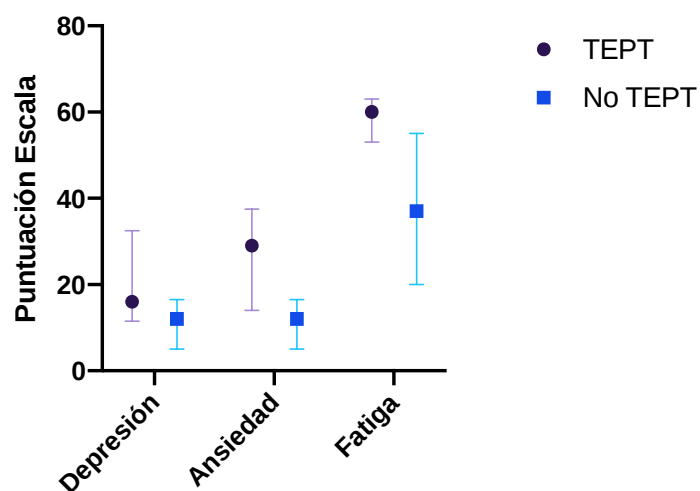
Se realizó un subanálisis de los ET tras estratificar a los pacientes según la refractariedad de la migraña (Tabla 25). Observamos que el número de ET sufridos por paciente no fue diferente entre aquellos con MR y los que no (χ^2 9,670; $p=0,208$). Sin embargo, analizando el tipo de ET, observamos que los pacientes con MR refirieron haber sufrido violación con mayor frecuencia que los pacientes sin MR. De los 19 pacientes con MR, 5 (26%) habían sufrido violación, en comparación con 2/97 (2%) que no tenían MR ($p=0,002$). Este acontecimiento ocurrió de media a los $15,9 \pm 9,0$ años, una edad significativamente más precoz que los otros ET que ocurrieron de media a los $33,26 \pm 15,58$ años ($p=0,050$). Ningún otro ET aislado fue más frecuente en la MR.

Impacto del TEPT sobre marcadores clínicos, bioquímicos y otras comorbilidades de la migraña.

Se realizó una comparación de síntomas autonómicos craneales, variables de gravedad de la migraña (en términos de discapacidad, impacto y calidad de vida), comorbilidades (ansiedad, depresión y fatiga) y niveles séricos de neuropéptidos (CGRP, VIP y PACAP), entre los pacientes con y sin TEPT (Tabla 24).

Encontramos que los pacientes con TEPT puntuaron más alto en las escalas de depresión [BDI= 16 (11,5-32,5) vs 12 (5-16,5); $p<0,001$], ansiedad [BAI= 29 (14-37,5) vs 12 (5-16,5); $p<0,001$] y fatiga [60 (53-63) vs 37 (20-55); $p<0,001$], que los pacientes sin TEPT (Figura 16, Tabla 24). No hubo diferencias significativas en las escalas de discapacidad e impacto de la migraña (MIDAS y HIT-6), ni en el número total de días de cefalea en los últimos 90 días.

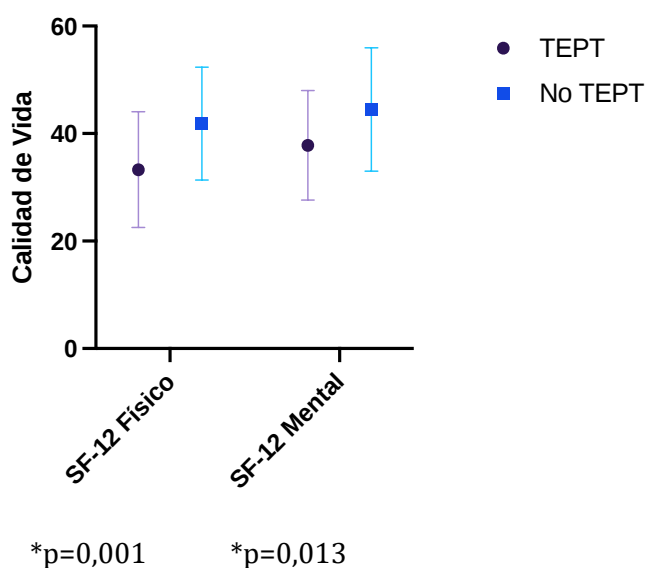
Figura 16.- Diferencia en las puntuaciones en las escalas de depresión, ansiedad y fatiga entre migrañosos con TEPT y sin TEPT.



* $p < 0,001$ en todas las comparaciones.

Los pacientes con TEPT reconocieron menor calidad de vida subjetiva en las escalas de percepción de la salud SF-12 física ($33,30 \pm 10,79$ vs $41,87 \pm 10,49$; $p=0,001$) y mental ($37,83 \pm 10,20$ vs $44,45 \pm 11,48$; $p=0,013$) (Figura 17, Tabla 24).

Figura 17.- Diferencia en las puntuaciones en las escalas de calidad de vida entre migrañosos con TEPT y sin TEPT.

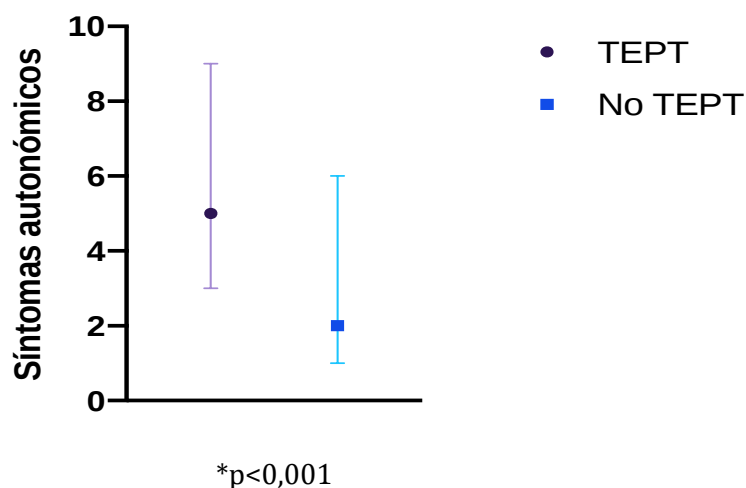


* $p=0,001$

* $p=0,013$

Los pacientes con TEPT reconocieron sufrir más síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea [5,0 (3-9)] que los pacientes sin TEPT [2,0 (1-6); $p=0,001$] (Figura 18, Tabla 24).

Figura 18.- Diferencia en el número de síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea entre migrañosos con TEPT y sin TEPT.



No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos interictales de CGRP, VIP y PACAP según la presencia de TEPT o no. Los niveles de VIP ($\rho=0,247$; $p=0,011$) y de PACAP ($\rho=0,242$; $p=0,013$) mostraron una correlación positiva con la puntuación de los síntomas autonómicos.

Tabla 24.- Diferencias clínicas, comorbilidades y niveles basales de neuropéptidos entre los pacientes con y sin TEPT.

	TEPT (N=23)	No TEPT (N=93)	P
MC, n (%)	20 (87)	61 (66)	0,046 [†] 0,073 [‡]
MR, n (%)	5 (22)	14 (15)	0,438 [†]
MIDAS	68,72 ± 77,02	53,79 ± 64,12	0,395
Total días con cefalea/90 días	51,80 ± 26,77	38,25 ± 30,28	0,113
HIT-6	61,54 ± 11,11	61,24 ± 18,83	0,937
BDI*	16 (11,5-32,5)	12 (5-16,5)	<0,001
BAI*	29 (14-37,5)	13 (6-22,5)	<0,001
Fatiga*	60 (53-63)	37 (20-55)	<0,001
Síntomas autonómicos*	5,0 (3-9)	2,0 (1-6)	0,001
SF-12- física	33,30 ± 10,79	41,87 ± 10,49	0,001
SF-12- mental	37,83 ± 10,20	44,45 ± 11,48	0,013
CGRP, pg/ml*	19,75 (16,7-22,4)	17,42 (12,7-24,2)	0,641
VIP, pg/ml*	130,34 (90,5-189,4)	123,71 (61,9-176,4)	0,352
PACAP, pg/ml*	432,52 (106,3-660,3)	137,16 (94,4-474,7)	0,162

*Mediana y límites. De lo contrario, media ± DE.

[†] Chi². [‡] T de Fisher. De lo contrario, T test o U de Mann-Whitney según distribución de la variable.

Abreviaturas: TEPT: trastorno por estrés postraumático, MC: migraña crónica, MR: migraña refractaria, MIDAS: escala de discapacidad de la migraña, HIT-6: test de impacto de las cefaleas, BDI: inventario de depresión de Beck, BAI: inventario de ansiedad de Beck, SF-12 y 16: cuestionarios de salud, CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina, VIP: péptido intestinal vasoactivo, PACAP: péptido relacionado con la adenilato ciclasa pituitaria.

Tabla 25.- Tipo de ETs referidos y diferencias según el grupo clínico (MC/ME y MR/no MR).

ET	No	Sí	MC N=81	ME N=35	<i>p</i>	MR N=19	No MR N=97	<i>p</i>
1.Accidente de coche, tren o avión.	85	31	20	11	0,52	8	23	0,117
2.Accidente industrial o de trabajo.	112	4	3	1	1,0*	1	3	0,536
3.Pérdida del hogar por un incendio.	116	0	0	0	N/A	0	0	N/A
4.Pérdida del hogar o de un miembro de la familia por inundaciones.	115	1	1	0	1,0*	1	0	0,172
5.Pérdida del hogar o de un miembro de la familia por un tornado o huracán.	115	1	0	1	1,0*	0	1	0,828
6.Pérdida del hogar o de un miembro de la familia por un terremoto.	116	0	0	0	N/A	0	0	N/A
7.Amenaza seria o daño a un miembro de la familia o amigo íntimo.	105	11	10	1	0,169*	10	1	0,399
8.Muerte inesperada de un miembro de la familia o amigo íntimo.	63	53	34	19	0,222	6	47	0,096
9.Estar próximo a ahogarse.	99	17	12	5	1,0*	2	15	0,733
10.Abuso físico.	101	15	13	2	0,226*	4	11	0,241
11.Sufrir graves quemaduras.	114	2	1	1	1,0*	0	2	0,684
12.Ser tomado como rehén.	116	0	0	0	N/A	0	0	N/A
13.Combate.	115	1	1	0	1,0*	0	1	0,828
14.Agresión.	102	14	10	4	1,0*	3	11	0,448
15.Violación.	109	7	6	1	0,440*	5	2	0,002
16.Incesto.	114	2	2	0	1,0*	0	0	N/A
17.Secuestro.	116	0	0	0	N/A	0	0	N/A
18.Otros**	87	29	21	8	0,818	3	26	0,395
*T de Fisher; En cualquier otro caso, test Chi ² .								
** Esta categoría incluye acoso laboral y escolar.								

6. DISCUSIÓN

6.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y COMORBILIDADES DE LA MUESTRA

Para la realización de esta Tesis Doctoral, reclutamos una muestra de pacientes representativa de la población general con migraña en cuanto al claro predominio femenino (8) y la media de edad en la 4ª década de la vida (4,5). Aunque el pico de incidencia de la ME es en la 3ª-4ª década y el de la MC podría ser un poco más tardío (6,13), no existieron diferencias entre los grupos en nuestra muestra probablemente por el esfuerzo realizado para emparejar a los pacientes por edad. La frecuencia de la MCA fue, de acuerdo a lo descrito en la literatura (4), aproximadamente $\frac{1}{4}$ tanto en el grupo MC como en el grupo ME.

Los pacientes con MC eran, según los esperado (14,15), pacientes con mayor discapacidad asociada como reflejaron las puntuaciones más elevadas en la escala MIDAS, que es la escala más utilizada para medir la discapacidad en migraña. Sin embargo, no encontramos diferencias en la escala de impacto HIT-6, ya que probablemente, por una parte, esta encuesta tiene una menor sensibilidad para reflejar las diferencias en el impacto de las cefaleas y, por otra parte, nuestros pacientes con ME estaban notablemente afectados.

De acuerdo con la literatura (7,15), aproximadamente un 20% de nuestros pacientes con MC sufrían también CAM, y padecían fibromialgia con mayor frecuencia que los ME, aunque éste último fue un diagnóstico autoinformado y por tanto estas cifras deben interpretarse con cautela. Además, los pacientes con MC sufrían más síntomas de alodinia cutánea, lo que refleja la sensibilización de las estructuras centrales involucradas en la migraña que se ha descrito en este grupo de pacientes (100). En cambio, no encontramos en nuestra serie diferencias en la distribución de factores de riesgo cardiovascular como la obesidad, la hipertensión, la dislipemia, la diabetes o el tabaquismo, que clásicamente se han descrito con más frecuencia en la MC (15).

En cuanto a la comorbilidad psiquiátrica, objeto de múltiples estudios en migraña a lo largo de la literatura, en la submuestra de 116 pacientes que se sometieron a su valoración de forma estandarizada, encontramos que los pacientes con MC puntuaron más alto en el Inventario de Ansiedad de Beck que los pacientes con ME, según lo esperado (15), pero curiosamente no encontramos diferencias en

las puntuaciones en el Inventario de Depresión, y las puntuaciones medias tanto en los pacientes con MC como ME indicaron síntomas mínimos de depresión. Esto resulta llamativo, dado que la depresión es una de las comorbilidades más frecuentes de la migraña, y se ha descrito que ocurre con el doble de frecuencia en MC que en ME (15). A pesar de haber utilizado una herramienta validada para su medición, los resultados no concuerdan con lo descrito en la literatura. También encontramos que los pacientes con MC puntuaron más alto en la Escala de severidad de la Fatiga que los pacientes con ME, de acuerdo con estudios previos (163).

6.2 ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue investigar la presencia de modificaciones epigenéticas en pacientes con migraña y su posible implicación en el riesgo de sufrir MC. Como se ha expuesto en la Introducción, son crecientes las evidencias sobre la implicación de factores epigenéticos en las enfermedades multifactoriales, y en particular, en los trastornos de dolor crónico. Es bien conocido que existe una base genética poligénica que condiciona la susceptibilidad a la migraña, pero los factores ambientales, también importantes, podrían determinar este riesgo a través de modificaciones epigenéticas que modularían el fenotipo de la migraña y jugarían un papel especialmente relevante en la MC. Son todavía escasos los estudios que han investigado posibles marcadores epigenéticos de la migraña, y este es el primer estudio que ha analizado el nivel de metilación de algunos de los genes descubiertos en los GWAS y algunos de los genes implicados en la respuesta al estrés en pacientes con migraña y su efecto sobre el riesgo de sufrir MC.

Con este objetivo, se realizó un análisis del nivel de metilación de determinadas islas CpG relacionadas con los genes candidatos, en muestras de sangre periférica, según el procedimiento descrito en Material y Métodos. Si bien es cierto que el “*gold standard*” para la determinación de los patrones de metilación del ADN es la secuenciación con bisulfito del genoma completo, que pretende cuantificar el estado de metilación de todas las C, tanto en dinucleótidos CpG como fuera de ellos, y que facilita el hallazgo de marcadores epigenéticos relacionados con la enfermedad, se debe tener en cuenta que el 70-80% de sus lecturas no son informativas porque proporcionan escasa información sobre la metilación en los

dinucleótidos CpG. Estas lecturas se asignan principalmente a regiones que no son CpG, y que muestran pequeños o ningún cambio en su metilación entre diferentes tejidos o tipos de células (128). Además, a pesar de la evidencia reciente de que la metilación de algunos dinucleótidos CpG se correlaciona con el nivel de expresión de algunos genes en algunos tipos celulares (179), la función de la metilación del ADN (entendiendo por tal el silenciamiento génico), está íntimamente relacionada con la densidad de C metiladas (133), y hay evidencias previas de que la metilación en regiones de baja densidad de CpGs no es capaz de bloquear la unión de factores de transcripción, de forma que la existencia de metilación diferencial en estas regiones no implicaría necesariamente un cambio en su función (134). La metodología empleada en este estudio, por tanto, mediante la conversión con bisulfito de islas CpG, consideramos que es más informativa sobre el grado de regulación epigenética de los genes por las influencias del ambiente.

Los resultados arrojan algunos datos interesantes que precisan confirmación con estudios de expresión y réplica en muestras independientes.

Genes asociados a la migraña en los GWAS

MTDH/AEG1 (Metadherina o Gen 1 elevado en astrocitos).

Los resultados de esta Tesis vinculan la metilación del exón 1 del gen *MTDH/AEG1* (Metadherina o Gen 1 elevado en astrocitos) con el riesgo de MC. Teóricamente, la metilación en el primer exón conduce al silenciamiento génico (132). Nuestros resultados muestran que, tras ajustar por factores de confusión, la hipermetilación en esta localización, aumentó el riesgo de MC frente a ME y frente a CS. La asociación con MC se mantuvo también tras ajustar por el subtipo MCA, que confiere mayor especificidad al diagnóstico de la migraña y que podría tener una susceptibilidad genética diferente (17), tras lo cual la asociación fue incluso más fuerte.

Por tanto, los resultados de este trabajo sugieren que existe una regulación epigenética diferencial de *MTDH/AEG1* en sujetos con MC, que conduciría teóricamente a una menor expresión de este gen. Esto se comprobó mediante el análisis de expresión en un subconjunto de pacientes de los que se disponía de muestra para el análisis del ARNm, en los que se encontró una menor expresión del

ARNm de *MTDH/AEG1* en MC que en CS. Aunque se observó también una menor expresión en MC que en ME, esta no alcanzó significación estadística. Esta observación necesita ser confirmada, debido al pequeño tamaño muestral y la baja potencia estadística para detectar diferencias entre los grupos clínicos. De la misma manera, no se detectó una correlación significativa entre la expresión de ARNm y el nivel de metilación de *MTDH/AEG1*, lo que precisa ser estudiado con un mayor tamaño muestral.

Cabe hacer constar que estudios previos de metilación del ADN han demostrado que, aún con pequeñas diferencias absolutas en los niveles de metilación, la dirección del efecto se correlaciona con el estado de expresión de los genes (180).

La implicación de *MTDH/AEG1* en la fisiopatología de la migraña fue propuesta en el primer GWAS, el de Anttila et al, en 2010 (34). En este GWAS, se encontró una asociación positiva entre el polimorfismo rs1835740, en 8q22, cercano al gen *MTDH/AEG1*, y migraña de cualquier tipo, siendo la asociación más fuerte con el subtipo MCA. Un metanálisis posterior de los genes candidatos hasta entonces sugeridos encontró una asociación modesta entre este gen y la migraña (varios SNPs en *MTDH/AEG1*, aunque no el previamente descubierto, mostraron una asociación significativa con la migraña), reforzando la importancia de este gen en su fisiopatología (35). Más tarde, el polimorfismo rs1835740 cercano a *MTDH/AEG1*, sólo alcanzó una asociación nominal en otro metanálisis, el de Gormley et al. (41). Este último, en el que se utilizaron datos del GWAS de Chasman et al. (36) donde se analizó un fenotipo no específico, podría haber infraestimado el papel de *MTDH/AEG1* en la migraña.

MTDH/AEG1 y homeostasis del glutamato en la migraña

Se ha demostrado que el polimorfismo rs1835740 incrementa la expresión del gen *MTDH/AEG1* tanto en líneas celulares linfoblásticas como fibroblásticas (34,181). Este es un gen que se ha estudiado fundamentalmente en relación con carcinogénesis y astrogliosis. Se ha observado en cultivos astrocitarios que *MTDH/AEG1* infrarregula al principal transportador de glutamato en el cerebro, o *EAAT2* (transportador de aminoácidos excitadores tipo 2) (34), que se expresa

constitutivamente en los astrocitos, la microglía y las células gliales de soporte del ganglio del trigémino, y es responsable de la recaptación del 90% del glutamato en la hendidura sináptica (182). Se ha propuesto que el acúmulo excesivo de este neurotransmisor en las sinapsis, derivado de la infrarregulación de *EAAT2*, proporcionaría un mecanismo putativo facilitador del ataque de migraña (34) (Figura 19).

Figura 19.- Esquema que refleja las teóricas consecuencias de la regulación al alza del gen *MTDH/AEG1* sobre la homeostasis del glutamato y los mecanismos de la migraña en el SNC.

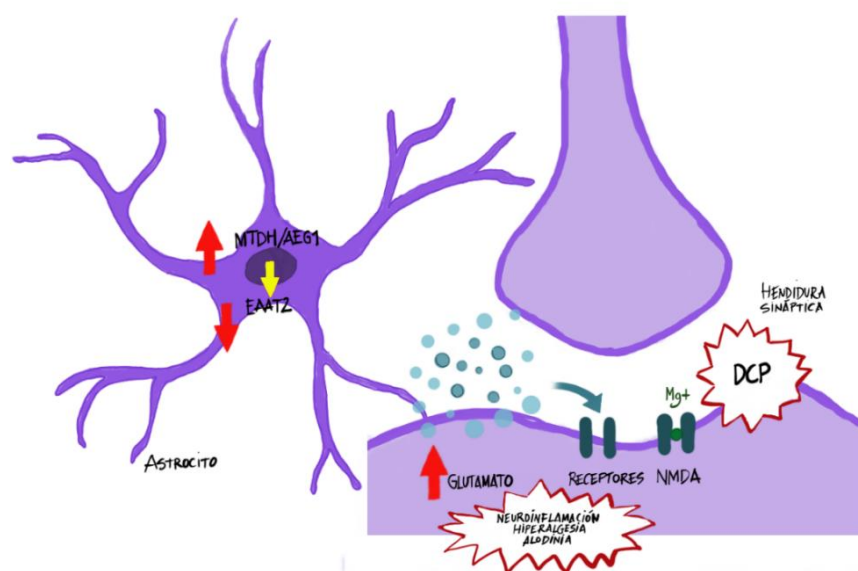


Ilustración propia.

MTDH/AEG1: Metadherina o Gen-1 elevado astrocitario, *EAAT2*: transportador 2 de aminoácidos excitadores, Receptores NMDA: N-metil-D-aspartato; receptores inotrópicos del glutamato, Mg+: Magnesio, DCP: Depresión cortical propagada.

La consecuencia esperada del silenciamiento de *MTDH/AEG1* a nivel del SNC es opuesta al mecanismo propuesto como facilitador del ataque de migraña, conduciendo en último lugar a una reducción teórica del glutamato libre en la hendidura sináptica, por lo que podría interpretarse en este contexto como un mecanismo adaptativo al dolor crónico, con el objetivo de atenuar la hiperexcitabilidad cerebral subyacente a la MC (44). Si bien, el diseño de nuestro estudio, por su carácter transversal, no nos permite concluir si los cambios

encontrados son causa o consecuencia del proceso patológico en estudio, y esta es una interpretación puramente especulativa, se sustenta en la evidencia de que la experiencia de dolor crónico puede producir cambios adaptativos persistentes a nivel epigenético (115). Dado el exceso de tono inflamatorio y los mecanismos neuroexcitadores implicados en la fisiopatología de la migraña (44), proponemos que podrían producirse en pacientes con MC cambios en la regulación de genes implicados en vías inflamatorias y excitadoras para amortiguar los efectos devastadores del dolor crónico y la hiperexcitabilidad cerebral.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro, y la importancia de la vía glutamatérgica en la fisiopatología de la migraña es conocida desde los estudios de la DCP y la MHF. La onda de despolarización que caracteriza a la DCP se inicia por una elevación del K⁺ y glutamato extracelular, debida a una alteración del gradiente iónico que se cree consecuencia de una despolarización-repolarización repetida de las neuronas corticales hiperexcitables (44). Las mutaciones de los 3 genes conocidas de la MHF conducen en última instancia a un incremento del glutamato extracelular, mecanismo por el cual se considera que predisponen a la migraña (23). La inhibición de la DCP con memantina, un antagonista de los receptores NMDA del glutamato, apoya su importancia en el inicio de la DCP (183). Según estas evidencias el glutamato juega un papel importante en el inicio del ataque de migraña y probablemente con mayor peso en la MCA, en la cual se acepta que la DCP es el fenómeno electrofisiológico responsable del aura. De acuerdo con esto, hemos encontrado que la hipermetilación del exón 1 de *MTDH/AEG1* se asoció con más fuerza a la MC tras ajustar por MCA, lo que sugiere una implicación mayor de esta modificación epigenética en el fenotipo MCA.

Pero, el sistema glutamatérgico es importante no sólo en el inicio, sino también en el mantenimiento del ataque de migraña. El mantenimiento del ataque de migraña se debe, al menos en parte, al desarrollo del fenómeno de sensibilización central, que consiste en una amplificación anormal de la neurotransmisión central del dolor y se cree responsable del fenotipo MC. Uno de los mecanismos implicados en este proceso es el incremento en la respuesta al glutamato liberado en las sinapsis, mediante una activación anómala de los receptores NMDA, que se expresan en las fibras nerviosas que inervan los vasos duros y se encuentran bloqueados en

estado de reposo por el ión Mg^{+} (182,184) (Figura 17). Por ello, la homeostasis glutamatérgica es fundamental también en la fisiopatología de la MC, y así, la hipermetilación del exón 1 de *MTDH/AEG1* se ha asociado en este estudio con MC, independientemente del fenotipo MSA o MCA.

Pero, además de sus efectos a nivel del SNC, existen evidencias de la importancia de la disregulación de la transmisión del glutamato a nivel del sistema nervioso periférico en la fisiopatología de la migraña. Estudios en animales muestran que la inyección de glutamato en el ganglio del trigémino, que se encuentra fuera de la barrera hemato-encefálica, puede sensibilizar las terminales nerviosas de las fibras aferentes del trigémino que contienen también receptores NMDA. Esto da lugar a un incremento del flujo sanguíneo dural y a la liberación de CGRP y sustancia P por las fibras del ganglio trigémino, produciendo inflamación neurogénica. Los niveles séricos de glutamato se han encontrado elevados en pacientes con migraña durante las crisis, y dado que las células gliales del ganglio trigémino contienen *EAAT2* se propone que los niveles elevados de glutamato en sangre periférica pueden inducir el fenómeno de inflamación neurogénica a través de la activación de los receptores NMDA en las neuronas del ganglio trigémino (182).

MTDH/AEG1, cefalea por abuso de medicación y marcadores de gravedad de la migraña.

Tras estratificar la muestra, la mayor metilación en el exón 1 de *MTDH/AEG1* también incrementó el riesgo de MC con CAM. Únicamente existe un pequeño estudio previo que trató de investigar modificaciones epigenéticas en relación con la CAM (146). Este estudio había identificado algún sitio CpG de interés, en relación sobre todo con vías dopaminérgicas implicadas en la adicción a sustancias y en algunas enfermedades neuropsiquiátricas. La potencia de este estudio, debido a su pequeño tamaño muestral, fue muy inferior a la del presente trabajo.

Como ya habían sugerido otros estudios, parece que *MTDH/AEG1* se asocia con las formas más complejas de migraña. En el GWAS de Anttila et al, el polimorfismo rs1835740, en estrecha proximidad con *MTDH/AEG1*, se asoció con más fuerza con el subtipo MCA (34), al igual que la metilación del exón 1 de

MTDH/AEG1 en nuestro estudio. En el trabajo de Ran et al, este polimorfismo, se asoció con cefalea en racimos y migraña, en pacientes que sufrían ambos procesos (181). Aunque los polimorfismos que se han sugerido en relación con la CAM se han concentrado principalmente en genes dopaminérgicos e involucrados en la adición a sustancias (185), es posible, a raíz de nuestros resultados, que *MTDH/AEG1* también juegue un papel importante en la CAM, otro tipo complejo de dolor de cabeza crónico en el que la sensibilización central, y por tanto, la neuroexcitación glutamatérgica debe desempeñar cierto papel (186).

A favor de ello, observamos que la metilación del exón 1 de *MTDH/AEG1* se correlacionó de forma directa con algunos parámetros clínicos que indican mayor severidad y discapacidad, como la puntuación en la escala MIDAS y el número total de días de cefalea/90 días, lo cual apoyaría la importancia de este gen en las formas más graves de migraña. Asimismo, y de forma consistente con lo anterior, la metilación en esta localización se correlacionó con parámetros bioquímicos como los niveles séricos de VIP y de PACAP, que, aunque de forma aún controvertida, podrían tener utilidad como biomarcadores de la MC, si bien no se observó una correlación con los niveles de CGRP, que es a día de hoy el mejor potencial biomarcador.

Únicamente un trabajo previo trató de investigar marcadores epigenéticos de cefalea crónica. Los resultados de este estudio, del que hablaremos más en detalle en un apartado específico, pues en él se ha fundamentado uno de los objetivos secundarios de esta Tesis Doctoral, muestran algunos sitios CpG asociados con la cronificación de la cefalea (145), no encontrándose entre ellos ninguno relacionado con el gen *MTDH/AEG1*, pero sí algunos relacionados con la señalización glutamatérgica.

MTDH/AEG1 y tratamientos preventivos

También observamos que *MTDH/AEG1* se encontró diferencialmente metilado en pacientes con MC estratificados según el tratamiento preventivo, de manera que, aquellos pacientes con MC en tratamiento con OnaBT, tuvieron niveles superiores de metilación en esta localización, que aquellos sin tratamiento. Además, que los pacientes con ME en tratamiento preventivo oral tuvieron niveles superiores

de metilación, que aquellos sin tratamiento preventivo. Estos resultados sugieren que la expresión de *MTDH/AEG1* sería teóricamente menor en aquellos pacientes con tratamiento preventivo activo, posiblemente también como un mecanismo adaptativo atenuador de las vías excitadoras, o como una respuesta al tratamiento en sí mismo, teniendo en cuenta que una de las propiedades antimigrañosas atribuidas a la OnaBT (187), y al Topiramato (188), está vinculada con su efecto sobre la transmisión glutamatérgica.

MTDH/AEG1 como biomarcador de la migraña crónica

Como punto fuerte de este análisis, cabe destacar que el estudio de la covarianza mostró una escasa influencia de la metilación de los otros genes sobre la metilación de *MTDH/AEG1*, lo cual indica una elevada consistencia de los resultados obtenidos en la regresión logística.

A pesar de toda esta línea de resultados que aparentemente asocian de forma consistente la metilación de *MTDH/AEG1* con la MC y con marcadores de gravedad de la migraña, el análisis de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de MC vs ME y CS no reveló un resultado esperanzador, de manera que sólo un 60% de los pacientes con MC serían correctamente clasificados según los niveles de metilación del exón 1 de *MTDH/AEG1* y un 40% de ellos serían incorrectamente discriminados según este análisis. Debemos tener en cuenta que, aunque estadísticamente significativas, las diferencias en los PMR de *MTDH/AEG1* son pequeñas en valores absolutos, lo cual limita su utilidad diagnóstica. Por otra parte, y como se ha tratado de explicar a lo largo de la Introducción, la migraña es una enfermedad compleja y genéticamente heterogénea, con participación de genes implicados en diversas vías funcionales, y con mayor complejidad incluso en el fenotipo MC, por lo que, a pesar de la aproximación realizada en esta Tesis Doctoral a su estudio, el hallazgo de un biomarcador epigenético para la MC es un reto que permanece aún sin alcanzar.

TGFβ1 (Factor de crecimiento transformante β1)

Aunque el nivel de metilación de *TGFβ1*, o factor de crecimiento transformante β1, no mostró diferencias significativas individualmente en la comparación entre MC, ME y CS emparejados por edad y sexo, en la regresión logística multivariable, al introducir el nivel de metilación de todos los genes como

variables independientes, para analizar su influencia sobre la categoría clínica (variable dependiente), se desvelaron nuevos efectos significativos. Al ser la migraña una enfermedad poligénica en la que participan múltiples vías funcionales, parece oportuno estudiar el efecto de la metilación de los genes en un modelo multifactorial que tenga en cuenta la metilación de otros genes. De esta forma, encontramos que la metilación de *TGFβ1* incrementó el riesgo de ME vs CS, y disminuyó el riesgo de MC vs ME tras ajustar por MCA.

La isla CpG cuyo nivel de metilación se analizó en relación a este gen, se encuentra en el extremo 5', que corresponde al promotor, donde teóricamente la metilación también conduce al silenciamiento génico (132), por lo que la consecuencia esperada de estos resultados sería una menor expresión de este gen en ME que en CS, y en MC que en ME. No obstante, dado que este efecto apareció sólo al ajustar por otros genes, y no se realizó un análisis estratificado tan a fondo como el previo, no se puede considerar un resultado tan consistente como el anterior.

El papel de *TGFβ1* en migraña ha sido escasamente estudiado. En un estudio de asociación de genes candidatos de 77 de los polimorfismos de los GWAS, el polimorfismo relacionado con este gen *TGFβ1* (rs1800469) se asoció con un menor riesgo de historia de migraña de cualquier tipo y de MSA (152). Como hemos explicado en la Introducción, algunos polimorfismos se relacionan, por mecanismos aún desconocidos, con una mayor o menor metilación de los promotores génicos, y esto se puede relacionar con su nivel de expresión (136). Aunque este estudio no se acompañó tampoco de un análisis de expresión, esta sería una hipótesis factible.

TGFβ1 es un factor de crecimiento mediador de múltiples funciones astrocitarias entre las que se encuentran la regulación de la supervivencia y diferenciación neuronal, la homeostasis cerebral, la angiogénesis, la formación de memoria y la plasticidad neuronal (151). Se sabe que los astrocitos, tanto de ratones como de humanos, incrementan la densidad estructural y funcional de las sinapsis glutamatérgicas a través de la liberación de *TGFβ1* en la corteza cerebral (151). La deficiencia de *TGFβ1* en el cerebro de ratones adultos se ha relacionado con la pérdida de densidad neuronal en el hipocampo, lo que comporta una pérdida de proteínas astrocitarias transportadoras del glutamato (*EAAT2* y *EAAT1*) (151). Este gen, pone, por tanto, de nuevo el foco en la neuroinflamación y en la

neurotransmisión glutamatérgica, como mecanismos esenciales implicados en la fisiopatología de la migraña.

Pero además, *TGF β 1* tiene funciones vasculares, siendo fundamental en el desarrollo del endotelio cerebral (150). El endotelio vascular juega un papel clave en el proceso de la inflamación neurógena, y en sujetos con MC se ha descrito la existencia de una disfunción endotelial, tanto a nivel cerebral como sistémica (189), que queda reflejada por el incremento del riesgo cardiovascular en migrañosos (190).

A la luz de nuestros resultados, la modulación epigenética de *TGF β 1* podría jugar un papel en la fisiopatología de la migraña, a través de la regulación tanto de vías neuronales como vasculares, arrojando más datos sobre la existencia de una metilación diferencial en genes implicados en la fisiopatología de la migraña según el fenotipo clínico.

ZNF555 (Proteína de los dedos de zinc 555)

Por último, en cuanto al análisis de la metilación de los genes de los GWAS, encontramos también que existe una metilación diferencial en una isla CpG intrónica en el gen *ZNF555* entre pacientes con MC, ME y CS. Aunque esta diferencia no fue significativa tras la corrección de comparaciones múltiples de Bonferroni, y el nivel de metilación en esta región no aumentó el riesgo de ninguna categoría clínica en el análisis univariado, en la regresión logística multivariable, teniendo en cuenta el nivel de metilación de otros genes y tras ajustar por sexo, edad y MCA, observamos que la metilación en esta localización disminuyó el riesgo de MC *versus* ME.

Dado que teóricamente la metilación en el cuerpo del gen se relaciona con una expresión incrementada del mismo (132), el efecto esperado de nuestros resultados sería una mayor expresión de *ZNF555* en pacientes con MC, si bien tampoco se realizó un estudio de expresión en este caso.

El polimorfismo rs4807347, localizado en *ZNF555*, que codifica para la proteína de los dedos de zinc 555, se asoció con migraña en un GWAS realizado en la población genéticamente aislada de una isla del Pacífico Sur, y fue replicado en una cohorte independiente de mujeres (38). Curiosamente la dirección del efecto

observado fue opuesta en las dos poblaciones testadas, siendo un factor protector en la primera, y de riesgo en la segunda.

Los estudios funcionales y de asociación a enfermedad de este gen son escasos. Cabe destacar, que la expresión de algunas de las proteínas de los dedos de zinc se vio que variaba de forma significativa en un estudio de DCP en ratas, sugiriendo un papel en la respuesta al estrés y en la reparación del ADN tras el ataque de migraña (156). La DCP es el fenómeno fisiológico que subyace al aura de la migraña, y de acuerdo con este trabajo, nuestros resultados muestran que la metilación de una isla intrónica de *ZNF555* puede jugar un papel en la MC con el subtipo MCA.

Otros genes de los GWAS

Aunque otros genes estudiados en este trabajo podrían ser *a priori* atractivos para el análisis, su nivel de metilación no ha podido vincularse con el riesgo de MC ni de ME.

Genes relacionados con la respuesta al estrés

Por primera vez en este estudio se ha planteado el análisis del estado de metilación de algunos de los genes implicados en la respuesta al estrés en pacientes con migraña. Este fue uno de nuestros objetivos primarios tras hipotetizar que el estrés, tanto precoz como postraumático, puede ser un factor de cronificación de la migraña a través de modificaciones epigenéticas en vías funcionales que participen tanto en la respuesta al estrés como en la fisiopatología de la migraña. En este análisis, obtuvimos también algunos resultados significativos.

NTSR1 (Receptor de la neurotensina tipo 1)

En la comparación individual de los niveles de metilación de los genes seleccionados entre los grupos clínicos, únicamente encontramos diferencias significativas en el nivel de metilación del *NTSR1* entre los pacientes con MC, ME y CS. En el análisis de regresión logística multivariable ajustado por edad y sexo, se observó que la metilación del *NTSR1* disminuyó el riesgo de MC vs ME.

La isla CpG cuyo nivel de metilación se estudió en relación con este gen, se encuentra en el promotor (extremo 5'), donde teóricamente, un menor nivel de

metilación implicaría una menor de represión del gen (132). Nuestros resultados sugieren, por tanto, que *NTSR1* podría estar más expresado en pacientes con MC que en ME, aunque no se realizó un estudio de expresión para confirmar dicho supuesto.

Este resultado es interesante puesto que el gen *NTSR1* codifica para el receptor 1 de la neurotensina (NTR1), y la neurotensina es un péptido endógeno implicado en la neurotransmisión del dolor (191). El NTR1 es un receptor de alta afinidad por la neurotensina, que se expresa en las neuronas serotoninérgicas de la médula rostral ventromedial (MRVM) (157). Esta estructura, situada en el tronco del encéfalo, es una de las estructuras capaces de modular la neurotransmisión dolorosa mediante proyecciones directas e indirectas sobre la médula espinal (157).

En modelos animales, se ha visto que la activación de NTR1 en las neuronas serotoninérgicas de la MRVM tiene un efecto antinociceptivo a través de la liberación de serotonina en el asta dorsal espinal (157). La microinyección de neurotensina en la MRVM produce antinocicepción dosis-dependiente, que, además, puede ser bloqueada por la administración tanto de un antagonista del NTR1 como de un antagonista de la serotonina (157).

Este hecho es relevante en la MC, ya que una disfunción en el sistema regulador descendente del dolor se ha hipotetizado que podría ser la base fisiopatológica de algunos estados de dolor crónico (192). Este sistema, está formado entre sus centros principales por la sustancia gris periacueductal (SGP), el núcleo cuneiforme y la MRVM. La SGP está conectada con las neuronas de la MRVM, de manera que el efecto antinociceptivo producido por su activación está mediado por su inervación excitadora hacia la MRVM, que a su vez proyecta hacia el asta dorsal de la médula espinal (191). Se especula que este sistema se encuentra alterado en los pacientes con MC, en los que existiría un desequilibrio entre las redes neuronales facilitadoras e inhibitoras del dolor, de manera que la vía inhibitoria descendente estaría alterada, facilitando, y siendo incapaz de frenar, la entrada de aferencias nociceptivas (13,193,194) (Figura 20).

Figura 20.- Esquema del papel del NTR1 en el sistema regulador descendente del dolor.

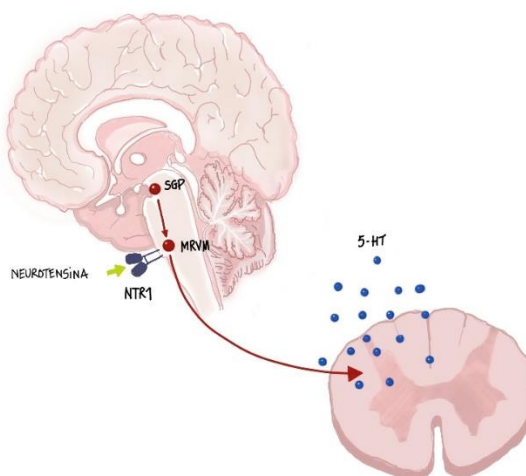


Ilustración propia.

NTR1: Receptor tipo 1 de la neurotensina; SGP: Sustancia gris periacueductal; MRVM: Médula Rostral Ventromedial; 5-HT: Serotonina.

Una mayor expresión del *NTSR1* en los pacientes con MC podría constituir un mecanismo epigenético adaptativo, que pretenda favorecer la actividad antinociceptiva descendente y atenuar los efectos deletéreos de la MC.

Pero además este gen se ha estudiado en relación con la respuesta al estrés temprano. En estudios realizados en ratas sometidas a separación materna precoz, que es uno de los procedimientos más frecuentemente utilizados para inducir estrés precoz en roedores, se ha visto que aumenta la metilación del promotor de *NTSR1* en la amígdala cerebral en la edad adulta, y que esto se correlaciona con una menor expresión de NTR1 en esta localización (104). En las ratas que habían sido sometidas a estrés precoz se observaron más síntomas de miedo condicionado, y se propuso que la metilación del promotor de *NTSR1* puede inducir a largo plazo vulnerabilidad a la ansiedad, el TEPT y otras fobias, aunque no se pudo demostrar una relación causal.

En definitiva, aunque los tejidos estudiados fueron diferentes, este estudio demuestra que el estrés precoz puede provocar cambios en la metilación de *NTSR1* que puede tener consecuencias sobre la salud en la edad adulta. Dada la

participación de este gen también en la neurotransmisión dolorosa, este estudio permitiría apoyar, además, que el estrés psicológico sufrido a una edad temprana podría causar modificaciones epigenéticas sobre vías funcionales que pueden favorecer una disregulación de las vías nociceptivas a largo plazo, favoreciendo la cronificación del dolor.

Otros genes relacionados con el estrés. NR3C1 y CRF.

Aunque individualmente, la metilación de ningún otro de los genes de estrés mostró diferencias significativas entre los grupos clínicos, al analizar su efecto sobre la categoría diagnóstica en un modelo de regresión multivariante incluyendo el nivel de metilación de los genes con prueba de razón de verosimilitud $p < 0,05$ como variables independientes y las categorías diagnósticas como variables dependientes, se desvelaron nuevos efectos significativos sobre el fenotipo de la migraña. De esta manera encontramos que la menor metilación de *NR3C1* aumentó el riesgo de MC frente a ME y que la mayor metilación de *CRF* aumentó el riesgo de MC frente a CS. Estos son dos genes implicados en el eje HHA, regulador de la respuesta al estrés.

NR3C1 tiene un especial interés por ser el gen más estudiado en relación con estrés precoz y postraumático. Este gen codifica para el receptor de glucocorticoides y su modificación epigenética parece ser una vía final común ante múltiples adversidades.

Uno de los primeros y más novedosos estudios sobre las consecuencias epigenéticas de las influencias ambientales en la infancia temprana, fue el de Weaver et al, en 2004 (112), que encontró una hipermetilación del promotor de *NR3C1* en hipocampos de ratas adultas que habían experimentado una privación precoz del cuidado materno. En este estudio, se observó además que la unión de los factores de transcripción al promotor de *NR3C1* estaba reducida, lo cual era consistente con la hipótesis de que la metilación de los promotores génicos conduce al silenciamiento transcripcional.

Resultados similares se encontraron posteriormente en humanos. En un estudio que analizó el nivel de metilación del promotor del *NR3C1* en hipocampos de adultos víctimas de suicidio que habían sufrido abusos en la infancia (113), se

observó que estaba hipermetilado en comparación con aquellos individuos que no habían sufrido abusos, y esto se correlacionó con una menor expresión del receptor de glucocorticoides. Aunque es controvertido que las marcas epigenéticas que ocurren a nivel cerebral se correlacionen con las marcas encontradas en muestras de sangre periférica, estos mismos resultados se encontraron en leucocitos periféricos de humanos en relación con adversidad infantil (195).

También estudios de TEPT se han centrado en investigar el estado de metilación de *NR3C1*. La metilación del promotor de este gen se encontró inversamente relacionada con los síntomas de TEPT en 122 veteranos de guerra (124). Llama la atención que mientras el estrés precoz se ha relacionado con una hipermetilación del promotor de *NR3C1*, los síntomas más graves de TEPT se han asociado con su menor metilación, lo cual sugiere que las consecuencias del estrés sobre la regulación epigenética de este gen son dinámicas y evolutivas (127), y además podrían diferir en función del tipo de ET y del momento en el que este tenga lugar (196).

La isla CpG cuyo nivel de metilación analizamos en este estudio en relación a *NR3C1*, es una isla de localización intrónica, donde teóricamente su menor metilación se relacionaría con una menor expresión génica (132). De acuerdo con los estudios de estrés precoz, la menor expresión del receptor de glucocorticoides se relacionaría con una hiperexcitabilidad cerebral en respuesta al estrés (112). Esto confluiría con las teorías que explican la migraña como una “enfermedad umbral”, en la que la repetición de los ataques produce una sensibilización central, que condiciona una hiperexcitabilidad cerebral frente a diversos estímulos aparentemente inocuos, ante los cuales el cerebro reacciona poniendo en marcha los mecanismos de la migraña (184). Sugerimos, ante estos resultados, que la menor metilación de *NR3C1* en pacientes con MC, podría ser un mecanismo epigenético facilitador de la misma.

Por su parte, *CRF*, codifica para el factor liberador de la hormona corticotropina, producida por la hipófisis, y que estimula a las glándulas suprarrenales para la producción de cortisol. Los estudios de estrés precoz en roedores, demuestran que este gen está menos metilado en los hipocampos de

aquellos animales sometidos a la separación materna precoz, y esto tiene consecuencias deletéreas sobre la neuroplasticidad cerebral (107).

La isla CpG cuyo nivel de metilación se analizó en relación con este gen se encuentra en el extremo 3'UTR, donde la función de la metilación no está bien definida. No se realizó tampoco un estudio de expresión en este caso. Pero este es otro resultado que nos indica la existencia de cambios en la metilación de otros genes implicados en la respuesta al estrés, que podrían constituir mecanismos adaptativos, facilitadores o inhibidores, en los pacientes con migraña, y cuya modificación podría deberse a la experiencia de estrés precoz o postraumático.

La posible modificación epigenética de *NR3C1* y *CRF* en pacientes con MC precisan confirmarse y acompañarse de estudios de expresión que exploren las potenciales consecuencias funcionales.

Genes relacionados con la cronificación de la cefalea

El análisis del nivel de metilación de los genes *SH2D5* y *NPTX2* surgió de un estudio publicado en 2018 por Winsvold et al. (145) en el que compararon desde una aproximación EWAS, la metilación del ADN (485.000 sitios CpG) de pacientes con cefalea episódica, frente a pacientes con cefalea que habían cronificado durante un periodo de seguimiento de 11 años, y encontraron que los dos sitios CpG diferencialmente metilados más fuertemente asociados con la cronificación de la cefalea fueron: Cg01010870, cerca del sitio de inicio de la transcripción de *SH2D5*; y Cg11086695, intergénico, 76kb aguas abajo de *NPTX2*. Sin embargo, estos sitios CpG fueron significativos en el metanálisis, pero ninguno de ellos mostró significación estadística ni en el estadio 1 ni en el 2 tras la corrección por múltiples tests.

SH2D5 y *NPTX2* son dos genes altamente expresados a nivel cerebral e implicados en funciones de neuroplasticidad, por lo que potencialmente podrían estar implicados en la cronificación de la cefalea. La importancia de los mecanismos epigenéticos en la MC se sustenta en gran medida por los cambios epigenéticos que la propia actividad neuronal ha demostrado producir sobre genes de neuroplasticidad (139). Aunque ninguno de estos dos genes se había asociado a la

migraña en los GWAS previos (40,41), su efecto podría haberse visto infraestimado al no haberse estudiado de forma específica la forma crónica de la enfermedad.

Uno de los objetivos secundarios de esta Tesis fue investigar la implicación de la modificación epigenética de estos dos genes en una muestra bien definida de MC, según la CIC-3 β , ya que, en el estudio de Winsvold et al, los cuestionarios utilizados no permitieron discernir la MC de otras cefaleas crónicas. Aunque teóricamente el grupo más prevalente dentro de la cefalea crónica diaria es la MC (5,6), los resultados podrían no ser generalizables a este grupo de pacientes.

Para ello, analizamos en este estudio el nivel de metilación de dos islas CpG representativas de estos dos genes, seleccionadas según el procedimiento descrito en Material y Métodos, y se compararon entre los grupos clínicos MC, ME y CS. Bajo esta aproximación, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de metilación en el exón 1 de *NPTX2* ni en el extremo 5' de *SH2D5* en pacientes con MC, ME y CS, de manera que no se pudo confirmar la implicación de la metilación de estos genes en la fisiopatología de la MC.

Aunque estos estudios no son directamente comparables por las diferencias metodológicas, discutiremos algunos puntos por los cuales creemos que la metodología empleada en nuestro estudio podría ser más adecuada con los objetivos planteados.

Por una parte, Winsvold et al. (145) emplearon una muestra reclutada prospectivamente, comparando 36 mujeres que progresaron de cefalea episódica a cefalea crónica durante un periodo de 11 años y 35 controles que permanecieron siendo episódicos. Este diseño sería más adecuado para sugerir mecanismos epigenéticos causantes de una enfermedad que nuestro enfoque de corte transversal, pero debe tenerse en cuenta que el envejecimiento en sí mismo puede haber influido en los resultados. La edad se asocia con cambios en la metilación del ADN, con una tendencia a la hipermetilación de los promotores y a la hipometilación global del genoma (128,197), por lo que es un factor de confusión a tener en cuenta en el diseño de este tipo de estudios. Como vemos en nuestros resultados, el nivel de metilación del exón 1 de *NPTX2* se correlacionó con la edad. Para tratar de controlar este factor en nuestro estudio, se utilizó una muestra perfectamente

emparejada por edad, y en la regresión logística se introdujo la edad como covariable para estudiar su efecto. En este caso, la edad no mostró ningún efecto en la predicción de la categoría clínica.

Por otra parte, el tamaño muestral de nuestro estudio fue muy superior al de Winsvold et al. (145), en el que se estudiaron 36 casos *versus* 35 controles, lo que podría haber condicionado unos resultados falsamente positivos.

Por último, y como hemos defendido anteriormente, consideramos que el análisis de la metilación de islas seleccionadas ricas en CpGs sería más informativa sobre el grado de regulación epigenética de los genes, que la secuenciación con bisulfito del epigenoma completo, que identifica diferencias en la metilación a nivel de dinucleótido CpG que podrían no implicar ningún cambio en la función del gen.

Puntos fuertes y limitaciones

En cuanto al análisis de la metilación del ADN, los puntos fuertes de este estudio son el diagnóstico clínico preciso realizado por neurólogos cualificados y de acuerdo con los criterios establecidos por la IHS, la muestra perfectamente emparejada por edad y sexo y un tamaño muestral superior al de los estudios previos de metilación del ADN en migraña (144–146). Además, la metodología, dirigida a investigar el nivel de metilación de algunos genes candidatos que ya han demostrado su implicación en la fisiopatología de la migraña en los GWAS.

Respecto a las limitaciones, empezando por el planteamiento del estudio, conocíamos *a priori* que los estudios del epigenoma completo o EWAS, que abordan el análisis del epigenoma a gran escala en un gran número de casos y controles, facilitan el hallazgo de resultados positivos así como la ausencia de sesgos en la selección de los participantes, y ya han demostrado pequeños cambios en la metilación del ADN asociados con la migraña (144) y otros trastornos complejos del cerebro (198,199). Sin embargo, esta es una técnica más costosa, que no fue factible con los recursos disponibles. Pero, además, la información que aporta sobre el grado de regulación epigenética de los genes por las influencias del ambiente sería cuestionable al analizar tanto la metilación de dinucleótidos CpG localizados en islas CpG como fuera de ellas. Para incrementar la rentabilidad de la búsqueda de marcadores epigenéticos con nuestro enfoque de genes candidatos, elegimos

aquellos genes que ya habían demostrado estar implicados en la fisiopatología de la migraña en los GWAS, o habían sido sugeridos en un estudio EWAS en cefalea crónica. También, al ser uno de nuestros objetivos primarios la búsqueda de algún marcador epigenético que vincule el estrés precoz o postraumático a la MC, nos dirigimos a una selección de genes que están implicados en la respuesta al estrés. Si bien, algunos trabajos sugieren que los estudios de genes candidatos tienden a producir falsos positivos (28), uno de los resultados principales de esta Tesis, la hipermetilación del exón 1 de *MTDH/AEG1* en la MC, se pudo confirmar con un estudio de expresión en una pequeña submuestra, añadiendo consistencia a este hallazgo.

Siguiendo con el diseño del estudio para el análisis de metilación, dado que se trata de un estudio de corte transversal, no podemos concluir si las modificaciones encontradas son causa o consecuencia del proceso patológico en estudio. Además, una de las propiedades intrínsecas de la metilación del ADN, es que, aunque estable, es un proceso dinámico (127), que puede cambiar por diversos factores a lo largo del tiempo, por lo que es difícil interpretar el hallazgo de una marca de metilación encontrada en un momento dado. Por ello, únicamente hemos podido especular, en función de las consecuencias esperables, su participación en posibles mecanismos adaptativos, facilitadores o inhibidores, de la MC.

En cuanto a la interpretación de los resultados de metilación, la variabilidad genética entre individuos y la propia variabilidad intrínseca entre los tejidos, son factores que podrían limitar la utilidad de los análisis de metilación, por las complejas interacciones que existen entre los factores genéticos y epigenéticos (130,200). También es limitante en la interpretación de nuestros resultados el hecho de que los mecanismos epigenéticos interaccionan entre sí, y en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado únicamente la metilación del ADN. Aunque este es el mecanismo mejor conocido, no podemos obviar la existencia de otros mecanismos reguladores de la expresión génica. En este sentido, dado que el método para el análisis de la metilación del ADN no está estandarizado en la actualidad, y no existe una solución para controlar estos factores, es preciso continuar investigando para mejorar la comprensión y la interpretación de los estudios epigenéticos.

Por último, y como limitación generalizada a todos los estudios que utilizan muestras de sangre periférica para el estudio de la regulación epigenética de procesos que tienen lugar a nivel cerebral, y como ya hemos comentado en la Introducción, los cambios epigenéticos son en gran medida tejido-específicos, y no conocemos la correlación que existe en la metilación de las islas CpG analizadas en la presente Tesis Doctoral, entre la sangre periférica y el cerebro. Sin embargo, algunos trabajos apoyan la utilidad de estas muestras para realizar comparaciones entre individuos, y con mayor motivo en las enfermedades consideradas sistémicas, en las que las modificaciones epigenéticas pueden trascender con mayor probabilidad al tejido cerebral (128,137).

6.3 ANÁLISIS DEL TRASTORNO POR ESTRÉS POSTRAUMÁTICO Y LOS EVENTOS VITALES TRAUMÁTICOS

La importancia de las comorbilidades radica en la posible existencia de mecanismos fisiopatológicos comunes (92). En esta línea se ha propuesto que el TEPT tiene consecuencias sobre circuitos neuronales que participan en la respuesta al estrés y que están implicados también en la hiperexcitabilidad cerebral subyacente en la migraña (102). Por otra parte, el estudio de las comorbilidades, alberga la posibilidad de que identificando y abordando la comorbilidad de una manera específica, pueda mejorar el pronóstico de la migraña, como se ha descrito en casos de TEPT asociado a otras condiciones de dolor crónico (201,202).

Frecuencia del TEPT y los ETs.

El análisis de la frecuencia y el impacto del TEPT en la migraña fue uno de los objetivos secundarios de este estudio, con el fin de investigar si existe una frecuencia superior de este trastorno en pacientes con migraña también en nuestro medio, como indicaron estudios previos realizados principalmente en EE. UU, y fundamentar así la búsqueda de modificaciones epigenéticas en genes implicados en la respuesta al estrés en pacientes con migraña.

Por una parte, la frecuencia del TEPT en el último año en nuestra muestra de pacientes con migraña (19,8%), fue superior a la que se ha encontrado en la población general. En un gran estudio poblacional americano se informó una

prevalencia del TEPT en el último año de entre un 2 y un 5% según el medio y el grupo de edad (121), mientras que en España se ha mostrado una prevalencia general del 0,6% (203).

La proporción de pacientes con TEPT encontrada en nuestro estudio en pacientes con migraña (19,8%) fue similar a la informada en otros estudios que evaluaron la frecuencia del TEPT en migrañosos (25%) (116,118), y fue aproximadamente el doble que en los controles sin migraña (116). Dado que estos estudios previos fueron realizados mayoritariamente en EE. UU, donde la frecuencia del TEPT es mayor que en nuestro país (121), esto podría condicionar un sesgo local. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio sugieren que las cifras son similares en nuestros pacientes con migraña y muestran también una frecuente comorbilidad entre estas dos patologías en nuestro medio.

Además, encontramos una mayor frecuencia del TEPT en el grupo de pacientes con MC (25%) que en ME (8,6%), pero que no alcanzó significación estadística. Esto coincidiría con trabajos anteriores que han descrito que los pacientes con MC sufren con más frecuencia TEPT que los pacientes con ME, habiendo informado una prevalencia en MC de hasta un 43% (117), lo que sugiere un papel del TEPT como factor de cronificación de la migraña. En nuestro análisis, aunque se observó una tendencia en este sentido, un pequeño tamaño de la muestra podría haber limitado la potencia de los resultados.

En cuanto al análisis de los ETs vitales, el más frecuente en global en este estudio fue el fallecimiento inesperado de un ser querido, coincidiendo con los resultados de estudios epidemiológicos (120,203). Este es un ET con un bajo riesgo condicional de TEPT (203) como reflejaron también nuestros resultados.

Algunos ET, como la amenaza seria o el daño a un miembro de la familia o amigo íntimo, los abusos físicos y la violación, fueron más frecuentes en los pacientes con TEPT, indicando un mayor riesgo condicional de TEPT para este tipo de acontecimientos.

No observamos diferencias en el número de pacientes que referían haber sufrido al menos un ET a lo largo de la vida entre pacientes con MC y ME, coincidiendo con otros autores (117), y siendo el porcentaje encontrado muy similar

al de la población general, en la que cerca de un 50% describen al menos un ET (203).

No encontramos tampoco ETs más frecuentes en el grupo MC que en ME. Sin embargo, al estratificar la muestra según la refractariedad de la migraña, encontramos que haber sufrido violación fue más frecuente en los pacientes con MR, suponiendo un 26% (5/19) de los mismos. Este porcentaje es drásticamente superior al de la población general en nuestro país, donde estudios poblacionales muestran que la prevalencia de violencia sexual, que incluye acoso, abusos y violación, es de un 3,4% (en concreto la prevalencia de violación de un 0,4%) y que este es el ET con mayor riesgo condicional de TEPT en mujeres (16,5%) (203). En nuestro estudio, este evento ocurrió de media a una edad significativamente más precoz que el resto de los ETs.

Aunque no está clara la relación entre los ETs y el riesgo de migraña, se sabe, que la vulnerabilidad a los efectos de un trauma es mayor a una edad temprana, y parece existir una relación entre las experiencias adversas infantiles y el desarrollo de algunas psicopatologías y condiciones de dolor crónico en la edad adulta (204). De la misma manera, algunos estudios retrospectivos han encontrado una asociación entre las experiencias adversas infantiles y el riesgo de migraña (122,205). Las mujeres migrañosas informan haber sufrido experiencias adversas (abusos físicos, psíquicos o sexuales, maltrato físico o psicológico, traumas familiares o domésticos) con mayor frecuencia que las no migrañosas y las puntuaciones en los cuestionarios de experiencias adversas se correlacionan con la frecuencia de la migraña, siendo superiores en MC (122).

Todo esto sugiere que el TEPT y este tipo de antecedentes traumáticos son frecuentes en los pacientes con migraña, especialmente con las formas más severas de la enfermedad (MC y MR), por lo que parecen ser un factor que condiciona un peor pronóstico y juega un papel en el riesgo de cronificación.

Impacto del TEPT en los pacientes con migraña.

En este trabajo, los pacientes que sufrieron TEPT puntuaron más alto en las escalas de depresión, ansiedad y fatiga, y peor en las de calidad de vida, coindiendo con lo encontrado por otros autores (118,119), excepto la fatiga que no había sido

evaluada con anterioridad. Estos factores podrían ser factores premórbidos que condicionan una vulnerabilidad tanto al TEPT como a la MC o ser consecuencia del impacto de la coexistencia de estos trastornos sobre la salud.

En la línea de nuestros resultados, un trabajo de Tietjen et al, que agrupó a los migrañosos según las constelaciones de comorbilidades que presentan, observó que el grupo de pacientes con migraña que asocian ansiedad y depresión, referían con mayor frecuencia abusos sexuales, físicos y emocionales, y este grupo es el que puntuó más alto en las escalas de discapacidad relacionada con la cefalea y peor en las de calidad de vida (206). Por el contrario, en nuestro estudio, los pacientes con TEPT no tenían más días de cefalea ni puntuaron más alto en las escalas de discapacidad o impacto de la migraña, lo que indica, a la luz de nuestros resultados, que estos pacientes podrían sufrir mayor carga de enfermedad a expensas de más comorbilidades y afectación de la calidad de vida, pero no a expensas de parámetros específicos de la migraña.

En nuestro análisis, no encontramos tampoco diferencias en los niveles séricos interictales de CGRP, VIP y PACAP entre los pacientes con y sin TEPT, por lo que no parece existir un impacto directo del TEPT sobre potenciales biomarcadores de la migraña. Desde nuestro conocimiento, no hay estudios previos que hayan evaluado las consecuencias del TEPT sobre los niveles de CGRP y VIP, mientras que sí se ha estudiado su relación con PACAP. Este es un péptido parasimpático que desempeña un papel clave en los circuitos neuronales que median la respuesta al estrés (207) y sus niveles plasmáticos han demostrado una correlación positiva con la severidad de los síntomas del TEPT en mujeres (208). A diferencia de este trabajo, en nuestro estudio, aunque la muestra estuvo mayoritariamente formada por mujeres (91%) no se realizó un análisis estratificado según el sexo y el TEPT se evaluó de forma cualitativa (sí/no) y no cuantitativa, no observando diferencias en los niveles basales de PACAP.

En cuanto a los síntomas autonómicos craneales, encontramos que fueron más numerosos en los pacientes con TEPT. Algunos síntomas autonómicos, como el incremento del calor facial (209) y la variabilidad en la frecuencia cardiaca y la presión arterial (207) son habituales en el TEPT. Según reflejan nuestros resultados, es posible que estos pacientes presenten más síntomas autonómicos craneales

relacionados con la cefalea que los migrañosos sin TEPT. Sin embargo, esta clase de síntomas son ampliamente reconocidos también por los pacientes con MC (210), por lo que la sobrerrepresentación de MC en el grupo de TEPT en nuestro estudio (87%) podría sesgar este resultado. A favor de ello, los niveles séricos tanto de VIP, como de PACAP, péptidos parasimpáticos implicados en la regulación de la respuesta autonómica (207,210), se correlacionaron con la cantidad de síntomas autonómicos, pero no se encontraron basalmente elevados en el TEPT, mientras que sí lo estaban en la MC.

Estos resultados sugieren que la presencia de TEPT, aunque no modifica parámetros específicos de la migraña, impacta de forma negativa en el pronóstico de estos pacientes, al asociarse con más comorbilidades y peor calidad de vida, por lo que es preciso investigarlo y abordarlo de forma específica en la consulta de cefaleas. Plantean además la necesidad de realizar nuevos estudios, con un mayor tamaño muestral, que aclaren la relación entre el TEPT y los ETs, y las formas más graves de migraña.

Puntos fuertes y limitaciones

En cuanto al análisis del TEPT y las ETs, este estudio cuenta con algunos puntos fuertes y limitaciones.

Como puntos fuertes debemos destacar, por una parte, la inclusión de un grupo de pacientes reclutados en un centro de Atención Primaria para evitar el sesgo de selección de aquellos pacientes con migraña más severamente afectados que se atienden habitualmente en una Unidad de Cefaleas. Por otra parte, debemos remarcar el asesoramiento recibido para la realización del protocolo y la interpretación de los cuestionarios por dos psicólogos clínicos.

En cuanto a las limitaciones: 1) El hecho de que sólo 116 pacientes (un 58% de los migrañosos) contestaron a los cuestionarios de evaluación psicológica, puede condicionar un sesgo de participación que haya sobreestimado las cifras del TEPT y los ETs. Sin embargo, su evaluación retrospectiva está sujeta a un sesgo de recuerdo (204), lo que podría infraestimar los resultados y compensar así en parte lo anterior. 2) El tamaño final de la muestra, formada por tan sólo 35 ME y 81 MC, podría limitar la potencia de los análisis, y la sobrerrepresentación de MC en el grupo de TEPT

(87%) podría condicionar algunos de los resultados, sin embargo, se han realizado algunas observaciones que sientan las bases para futuros estudios. 3) Otro factor limitante en el análisis de la frecuencia del TEPT y los ETs es la ausencia de un grupo control, por lo que únicamente se han podido realizar comparaciones frente a las cifras descritas previamente en la población general, que varían según el medio en el que se analicen, y podrían no ser extrapolables a la población actual de Cantabria. 4) Por último, en el análisis de los neuropéptidos séricos, son bien conocidas las dificultades metodológicas en la técnica de determinación (81) y las controversias sobre su utilidad como biomarcadores de la migraña (211), pero cabe destacar el esfuerzo realizado por minimizar los tiempos de almacenamiento y procesamiento de las muestras y que se han utilizado los mismos kits de ELISA empleados anteriormente por otros autores.

7. CONCLUSIONES

1. Existen diferencias en la metilación de algunos genes en sangre periférica en pacientes con MC y ME, que podrían implicar diferencias en su grado de expresión, y constituir mecanismos adaptativos, facilitadores o atenuadores, al dolor y estrés crónicos.
2. La metilación de una isla CpG en el exón 1 de *MTDH/AEG1* (CRM 8: 97644695-97644898 bp) se asocia con la MC, con parámetros clínicos de gravedad de la misma, con biomarcadores bioquímicos, y con la CAM, y se relaciona con una menor expresión de este gen en los pacientes con MC. *MTDH/AEG1* está implicado en la homeostasis del glutamato y las teóricas consecuencias de esta modificación epigenética podrían constituir un mecanismo adaptativo atenuador de la hiperexcitabilidad cerebral de la MC.
3. La metilación de una isla CpG en el promotor de *NTSR1* (CRM 20: 627708969-62709114 bp) disminuye el riesgo de MC *versus* ME. Este gen está implicado en la regulación central de la transmisión nociceptiva y se modifica epigenéticamente por estrés precoz. Las teóricas consecuencias de este hallazgo podrían representar un mecanismo adaptativo facilitador de la vía inhibitoria descendente del dolor, además de sugerir que vías comunes entre la respuesta al estrés y la migraña pueden estar epigenéticamente moduladas en la MC.
4. Encontramos una comorbilidad frecuente entre el TEPT y la migraña, sobre todo MC, que impacta de forma negativa sobre el pronóstico de estos pacientes al asociarse con más comorbilidades y peor calidad de vida. Esto apoya su importancia como factor de cronificación, sugiere que los antecedentes traumáticos deben ser investigados y abordados en la consulta de cefaleas, especialmente en aquellos pacientes con MR, y respalda la importancia del estudio de las vías de estrés en la migraña.
5. La epigenética es un campo joven de la ciencia y el estudio de marcadores epigenéticos de enfermedad supone aún un reto por las múltiples limitaciones metodológicas, pero existen evidencias de la importancia de las modificaciones epigenéticas por las influencias del ambiente en la cronificación del dolor y en particular de la migraña, algunas de las cuales se revelan en esta tesis, y requieren confirmación en estudios adicionales.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Pascual Gómez J, Sánchez del Río González M, Jiménez Hernández MD, Láinez Andrés JM, Mateos Marcos V, Leira Muiño R, et al. Actitud del neurólogo español frente a la migraña: resultados del proyecto CIEN-mig (I). *Rev Neurol*. 2010;50(10):577.
2. Pérez Pereda S, Toriello Suárez M, González Quintanilla V, Pascual Gómez J, Oterino Durán A. Necesidad real y consumo de recursos en las unidades de cefalea: estudio observacional retrospectivo sobre una cohorte en Cantabria. *Rev Neurol*. 2019;68(12):510.
3. J.M Lainez, J. Pascual, F. Velasco, J.J. Zarranz. *Neurología*. Capítulo 9- Cefaleas y algias craneofaciales. 6ª. Elsevier; 2018. 125-153 p.
4. Matías-Guiu J, Porta-Etessam J, Mateos V, Díaz-Insa S, Lopez-Gil A, Fernández C, et al. One-year prevalence of migraine in Spain: a nationwide population-based survey. *Cephalalgia Int J Headache*. 2011;31(4):463-70.
5. Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD, Reed ML. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *JAMA*. 1992;267(1):64-9.
6. Castillo J, Muñoz P, Guitera V, Pascual J. Kaplan Award 1998. Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache*. 1999;39(3):190-6.
7. Natoli JL, Manack A, Dean B, Butler Q, Turkel CC, Stovner L, et al. Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia Int J Headache*. 2010;30(5):599-609.
8. Vetvik KG, MacGregor EA. Sex differences in the epidemiology, clinical features, and pathophysiology of migraine. *Lancet Neurol*. 2017;16(1):76-87.
9. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia Int J Headache*. 2018;38(1):1-211.
10. 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.
11. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2163-96.
12. Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen H-U, Jönsson B, CDBE2010 study group, et al. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol*. 2012;19(1):155-62.
13. May A, Schulte LH. Chronic migraine: risk factors, mechanisms and treatment. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(8):455-64.
14. Carod Artal FJ, Irimia Sieira P, Ezpeleta Echevarri D. Migraña crónica: definición, epidemiología, factores de riesgo y tratamiento. *Rev Neurol*. 2012;54(10):629.
15. Buse DC, Manack A, Serrano D, Turkel C, Lipton RB. Sociodemographic and comorbidity profiles of chronic migraine and episodic migraine sufferers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(4):428-32.

16. Munakata J, Hazard E, Serrano D, Klingman D, Rupnow MFT, Tierce J, et al. Economic burden of transformed migraine: results from the American Migraine Prevalence and Prevention (AMPP) Study. *Headache*. 2009;49(4):498-508.
17. Russell MB, Iselius L, Olesen J. Migraine without aura and migraine with aura are inherited disorders. *Cephalalgia Int J Headache*. 1996;16(5):305-9.
18. Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A, Ophoff RA. Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol*. 2007;6(6):521-32.
19. Chen CCM, Mengersen KL, Keith JM, Martin NG, Nyholt DR. Linkage and heritability analysis of migraine symptom groupings: a comparison of three different clustering methods on twin data. *Hum Genet*. 2009;125(5-6):591-604.
20. Chalmer MA, Rasmussen AH, International Headache Genetics Consortium, 23andme Research Team, Kogelman LJA, Olesen J, et al. Chronic migraine: Genetics or environment? *Eur J Neurol*. 2021;28(5):1726-36.
21. Gervil M, Ulrich V, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. Migraine without aura: a population-based twin study. *Ann Neurol*. 1999;46(4):606-11.
22. Ulrich V, Gervil M, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. *Ann Neurol*. 1999;45(2):242-6.
23. Sutherland HG, Albury CL, Griffiths LR. Advances in genetics of migraine. *J Headache Pain*. 2019;20(1):72.
24. Oterino A, Valle N, Bravo Y, Muñoz P, Sánchez-Velasco P, Ruiz-Alegría C, et al. MTHFR T677 homozygosis influences the presence of aura in migraineurs. *Cephalalgia Int J Headache*. 2004;24(6):491-4.
25. Kowa H, Yasui K, Takeshima T, Urakami K, Sakai F, Nakashima K. The homozygous C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for migraine. *Am J Med Genet*. 2000;96(6):762-4.
26. Lea RA, Ovcacic M, Sundholm J, MacMillan J, Griffiths LR. The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant C677T influences susceptibility to migraine with aura. *BMC Med*. 2004;2:3.
27. Kaunisto MA, Kallela M, Hämäläinen E, Kilpikari R, Havanka H, Harno H, et al. Testing of variants of the MTHFR and ESR1 genes in 1798 Finnish individuals fails to confirm the association with migraine with aura. *Cephalalgia Int J Headache*. 2006;26(12):1462-72.
28. de Vries B, Anttila V, Freilinger T, Wessman M, Kaunisto MA, Kallela M, et al. Systematic re-evaluation of genes from candidate gene association studies in migraine using a large genome-wide association data set. *Cephalalgia Int J Headache*. 2016;36(7):604-14.
29. Gonda X, Rihmer Z, Juhasz G, Zsombok T, Bagdy G. High anxiety and migraine are associated with the s allele of the 5HTTLPR gene polymorphism. *Psychiatry Res*. 2007;149(1-3):261-6.

30. Borroni B, Brambilla C, Liberini P, Rao R, Archetti S, Gipponi S, et al. Functional serotonin 5-HTTLPR polymorphism is a risk factor for migraine with aura. *J Headache Pain*. 2005;6(4):182-4.
31. Todt U, Freudenberg J, Goebel I, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Rietschel M, et al. Variation of the serotonin transporter gene SLC6A4 in the susceptibility to migraine with aura. *Neurology*. 2006;67(9):1707-9.
32. Schürks M, Rist PM, Kurth T. 5-HTTLPR polymorphism in the serotonin transporter gene and migraine: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia Int J Headache*. 2010;30(11):1296-305.
33. Lafrenière RG, Cader MZ, Poulin J-F, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, et al. A dominant-negative mutation in the TREK1 potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med*. 2010;16(10):1157-60.
34. Anttila V, Stefansson H, Kallela M, Todt U, Terwindt GM, Calafato MS, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet*. 2010;42(10):869-73.
35. Ligthart L, de Vries B, Smith AV, Ikram MA, Amin N, Hottenga J-J, et al. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2011;19(8):901-7.
36. Chasman DI, Schürks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer LJ, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet*. 2011;43(7):695-8.
37. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, Malik R, Kallela M, Terwindt GM, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet*. 2012;44(7):777-82.
38. Cox HC, Lea RA, Bellis C, Carless M, Dyer TD, Curran J, et al. A genome-wide analysis of «Bounty» descendants implicates several novel variants in migraine susceptibility. *Neurogenetics*. 2012;13(3):261-6.
39. Carreño O, Corominas R, Fernández-Morales J, Camiña M, Sobrido M-J, Fernández-Fernández JM, et al. SNP variants within the vanilloid TRPV1 and TRPV3 receptor genes are associated with migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2012;159B(1):94-103.
40. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, Kurth T, Bettella F, McMahon G, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet*. 2013;45(8):912-7.
41. Gormley P, Anttila V, Winsvold BS, Palta P, Esko T, Pers TH, et al. Meta-analysis of 375,000 individuals identifies 38 susceptibility loci for migraine. *Nat Genet*. 2016;48(8):856-66.
42. Goadsby PJ. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2007;13(1):39-44.
43. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine--current understanding and treatment. *N Engl J Med*. 2002;346(4):257-70.

44. Dodick DW. A Phase-by-Phase Review of Migraine Pathophysiology. *Headache*. 2018;58 Suppl 1:4-16.
45. Goadsby PJ. Migraine, aura, and cortical spreading depression: why are we still talking about it? *Ann Neurol*. 2001;49(1):4-6.
46. Giffin NJ, Ruggiero L, Lipton RB, Silberstein SD, Tvedskov JF, Olesen J, et al. Premonitory symptoms in migraine: an electronic diary study. *Neurology*. 2003;60(6):935-40.
47. Maniyar FH, Sprenger T, Monteith T, Schankin C, Goadsby PJ. Brain activations in the premonitory phase of nitroglycerin-triggered migraine attacks. *Brain J Neurol*. 2014;137(Pt 1):232-41.
48. Schulte LH, May A. The migraine generator revisited: continuous scanning of the migraine cycle over 30 days and three spontaneous attacks. *Brain J Neurol*. 2016;139(Pt 7):1987-93.
49. Maniyar FH, Sprenger T, Schankin C, Goadsby PJ. Photoc hypersensitivity in the premonitory phase of migraine--a positron emission tomography study. *Eur J Neurol*. 2014;21(9):1178-83.
50. Maniyar FH, Sprenger T, Schankin C, Goadsby PJ. The origin of nausea in migraine-a PET study. *J Headache Pain*. 2014;15:84.
51. Russell MB, Olesen J. A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain J Neurol*. 1996;119 (Pt 2):355-61.
52. Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*. 1944;7(6):359-90.
53. Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med*. 1994;331(25):1689-92.
54. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, et al. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4687-92.
55. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*. 2002;8(2):136-42.
56. Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*. 2006;59(4):652-61.
57. Kaube H, Herzog J, Käufer T, Dichgans M, Diener HC. Aura in some patients with familial hemiplegic migraine can be stopped by intranasal ketamine. *Neurology*. 2000;55(1):139-41.
58. Lambert GA, Truong L, Zagami AS. Effect of cortical spreading depression on basal and evoked traffic in the trigeminovascular sensory system. *Cephalalgia Int J Headache*. 2011;31(14):1439-51.
59. Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, et al. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med*. 1995;1(7):658-60.

60. Moskowitz MA. Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology*. 1993;43(6 Suppl 3):S16-20.
61. Baldacci F, Lucchesi C, Cafalli M, Poletti M, Ulivi M, Vedovello M, et al. Migraine features in migraineurs with and without anxiety-depression symptoms: a hospital-based study. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;132:74-8.
62. Durham P, Papapetropoulos S. Biomarkers associated with migraine and their potential role in migraine management. *Headache*. 2013;53(8):1262-77.
63. Lee MJ, Lee S-Y, Cho S, Kang E-S, Chung C-S. Feasibility of serum CGRP measurement as a biomarker of chronic migraine: a critical reappraisal. *J Headache Pain*. 2018;19(1):53.
64. Diener H-C, Dodick DW, Goadsby PJ, Lipton RB, Olesen J, Silberstein SD. Chronic migraine--classification, characteristics and treatment. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(3):162-71.
65. Schwedt TJ, Chong CD, Chiang C-C, Baxter L, Schlaggar BL, Dodick DW. Enhanced pain-induced activity of pain-processing regions in a case-control study of episodic migraine. *Cephalalgia Int J Headache*. 2014;34(12):947-58.
66. Schulte LH, Allers A, May A. Hypothalamus as a mediator of chronic migraine: Evidence from high-resolution fMRI. *Neurology*. 2017;88(21):2011-6.
67. Androulakis XM, Krebs K, Peterlin BL, Zhang T, Maleki N, Sen S, et al. Modulation of intrinsic resting-state fMRI networks in women with chronic migraine. *Neurology*. 2017;89(2):163-9.
68. Lee MJ, Park B-Y, Cho S, Kim ST, Park H, Chung C-S. Increased connectivity of pain matrix in chronic migraine: a resting-state functional MRI study. *J Headache Pain*. 2019;20(1):29.
69. Kim JH, Suh S-I, Seol HY, Oh K, Seo W-K, Yu S-W, et al. Regional grey matter changes in patients with migraine: a voxel-based morphometry study. *Cephalalgia Int J Headache*. 2008;28(6):598-604.
70. Valfrè W, Rainero I, Bergui M, Pinessi L. Voxel-based morphometry reveals gray matter abnormalities in migraine. *Headache*. 2008;48(1):109-17.
71. Domínguez C, López A, Ramos-Cabrer P, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, Villalba C, et al. Iron deposition in periaqueductal gray matter as a potential biomarker for chronic migraine. *Neurology*. 2019;92(10):e1076-85.
72. Pozo-Rosich P, Coppola G, Pascual J, Schwedt TJ. How does the brain change in chronic migraine? Developing disease biomarkers. *Cephalalgia Int J Headache*. 2020;333102420974359.
73. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia Int J Headache*. 2002;22(1):54-61.
74. Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G, et al. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia Int J Headache*. 1995;15(5):384-90.

75. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol.* 1990;28(2):183-7.
76. Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Camblor P, Pascual J. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology.* 2013;81(14):1191-6.
77. Domínguez C, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, Sobrino T, Rodríguez-Osorio X, López A, et al. CGRP and PTX3 as Predictors of Efficacy of Onabotulinumtoxin Type A in Chronic Migraine: An Observational Study. *Headache.* 2018;58(1):78-87.
78. Cernuda-Morollón E, Ramón C, Martínez-Camblor P, Serrano-Pertierra E, Larrosa D, Pascual J. OnabotulinumtoxinA decreases interictal CGRP plasma levels in patients with chronic migraine. *Pain.* 2015;156(5):820-4.
79. Tepper SJ. History and Review of anti-Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Therapies: From Translational Research to Treatment. *Headache.* 2018;58 Suppl 3:238-75.
80. Ramón C, Cernuda-Morollón E, Pascual J. Calcitonin gene-related peptide in peripheral blood as a biomarker for migraine. *Curr Opin Neurol.* 2017;30(3):281-6.
81. Edvinsson L, Ekman R, Goadsby PJ. Measurement of vasoactive neuropeptides in biological materials: problems and pitfalls from 30 years of experience and novel future approaches. *Cephalalgia Int J Headache.* 2010;30(6):761-6.
82. Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, Fahrenkrug J, Olesen J, Ashina M. Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine. *Cephalalgia Int J Headache.* 2008;28(3):226-36.
83. Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Alvarez R, Larrosa D, Ramón C, Pascual J. Increased VIP levels in peripheral blood outside migraine attacks as a potential biomarker of cranial parasympathetic activation in chronic migraine. *Cephalalgia Int J Headache.* 2015;35(4):310-6.
84. Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Ramón C, Larrosa D, Serrano-Pertierra E, Pascual J. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache.* 2014;54(6):987-95.
85. Riesco N, Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Pérez-Alvarez AI, Verano L, García-Cabo C, et al. Relationship between serum levels of VIP, but not of CGRP, and cranial autonomic parasympathetic symptoms: A study in chronic migraine patients. *Cephalalgia Int J Headache.* 2017;37(9):823-7.
86. Schytz HW, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J, Ashina M. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain J Neurol.* 2009;132(Pt 1):16-25.
87. Zagami AS, Edvinsson L, Goadsby PJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and migraine. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014;1(12):1036-40.
88. Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J, Szabó N, et al. Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia Int J Headache.* 2013;33(13):1085-95.

89. Cernuda-Morollón E, Riesco N, Martínez-Camblor P, Serrano-Pertierra E, García-Cabo C, Pascual J. No Change in Interictal PACAP Levels in Peripheral Blood in Women With Chronic Migraine. *Headache*. 2016;56(9):1448-54.
90. Riesco N, Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Pérez-Pereda S, Pascual J. Peripheral, Interictal Serum S100B Levels are Not Increased in Chronic Migraine Patients. *Headache*. 2020;60(8):1705-11.
91. Irimia P, Martínez-Valbuena I, Mínguez-Olaondo A, Domínguez-Vivero C, Sánchez-Arias J-A, Martínez-Vila E, et al. Interictal amylin levels in chronic migraine patients: A case-control study. *Cephalalgia Int J Headache*. 2021;41(5):604-12.
92. Lipton RB, Silberstein SD. Why study the comorbidity of migraine? *Neurology*. 1994;44(10 Suppl 7):S4-5.
93. Jette N, Patten S, Williams J, Becker W, Wiebe S. Comorbidity of migraine and psychiatric disorders--a national population-based study. *Headache*. 2008;48(4):501-16.
94. Pichot P, López-Ibor Aliño JJ, Valdés Miyar M. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: DSM-IV. Barcelona: Masson; 2001.
95. Wolff HG. PERSONALITY FEATURES AND REACTIONS OF SUBJECTS WITH MIGRAINE. *Arch Neurol Psychiatry*. 1937;37(4):895-921.
96. Huber D, Henrich G. Personality traits and stress sensitivity in migraine patients. *Behav Med Wash DC*. 2003;29(1):4-13.
97. Silberstein SD, Lipton RB, Breslau N. Migraine: association with personality characteristics and psychopathology. *Cephalalgia Int J Headache*. 1995;15(5):358-69; discussion 336.
98. Alvarez-Astorga A, García-Azorín D, Hernández M, de la Red H, Sotelo E, Uribe F, et al. Pain catastrophising in a population of patients with migraine. *Neurol Barc Spain*. 2019;
99. Bond DS, Buse DC, Lipton RB, Thomas JG, Rathier L, Roth J, et al. Clinical Pain Catastrophizing in Women With Migraine and Obesity. *Headache*. 2015;55(7):923-33.
100. Bigal ME, Lipton RB. Modifiable risk factors for migraine progression. *Headache*. 2006;46(9):1334-43.
101. Kelman L. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia Int J Headache*. 2007;27(5):394-402.
102. Dresler T, Caratozzolo S, Guldolf K, Huhn J-I, Loiacono C, Niiberg-Pikksööt T, et al. Understanding the nature of psychiatric comorbidity in migraine: a systematic review focused on interactions and treatment implications. *J Headache Pain*. 2019;20(1):51.
103. Hunter RG. Epigenetic effects of stress and corticosteroids in the brain. *Front Cell Neurosci*. 2012;6:18.
104. Toda H, Boku S, Nakagawa S, Inoue T, Kato A, Takamura N, et al. Maternal separation enhances conditioned fear and decreases the mRNA levels of the neurotensin receptor 1 gene with hypermethylation of this gene in the rat amygdala. *PloS One*. 2014;9(5):e97421.

105. Rodenas-Ruano A, Chávez AE, Cossio MJ, Castillo PE, Zukin RS. REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci.* 2012;15(10):1382-90.
106. Champagne FA, Weaver ICG, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology.* 2006;147(6):2909-15.
107. Wang A, Nie W, Li H, Hou Y, Yu Z, Fan Q, et al. Epigenetic upregulation of corticotrophin-releasing hormone mediates postnatal maternal separation-induced memory deficiency. *PloS One.* 2014;9(4):e94394.
108. Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry.* 2009;65(9):760-9.
109. Kinnally EL, Capitanio JP, Leibel R, Deng L, LeDuc C, Haghighi F, et al. Epigenetic regulation of serotonin transporter expression and behavior in infant rhesus macaques. *Genes Brain Behav.* 2010;9(6):575-82.
110. Wu Y, Patchev AV, Daniel G, Almeida OFX, Spengler D. Early-life stress reduces DNA methylation of the *Pomc* gene in male mice. *Endocrinology.* 2014;155(5):1751-62.
111. Bagot RC, Zhang T-Y, Wen X, Nguyen TTT, Nguyen H-B, Diorio J, et al. Variations in postnatal maternal care and the epigenetic regulation of metabotropic glutamate receptor 1 expression and hippocampal function in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109 Suppl 2:17200-7.
112. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004;7(8):847-54.
113. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci.* 2009;12(3):342-8.
114. Penas C, Navarro X. Epigenetic Modifications Associated to Neuroinflammation and Neuropathic Pain After Neural Trauma. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:158.
115. Liang L, Lutz BM, Bekker A, Tao Y-X. Epigenetic regulation of chronic pain. *Epigenomics.* 2015;7(2):235-45.
116. Smitherman TA, Kolivas ED. Trauma exposure versus posttraumatic stress disorder: relative associations with migraine. *Headache.* 2013;53(5):775-86.
117. Peterlin BL, Tietjen G, Meng S, Lidicker J, Bigal M. Post-traumatic stress disorder in episodic and chronic migraine. *Headache.* 2008;48(4):517-22.
118. Peterlin BL, Tietjen GE, Brandes JL, Rubin SM, Drexler E, Lidicker JR, et al. Posttraumatic stress disorder in migraine. *Headache.* 2009;49(4):541-51.
119. Rao AS, Scher AI, Vieira RVA, Merikangas KR, Metti AL, Peterlin BL. The Impact of Post-Traumatic Stress Disorder on the Burden of Migraine: Results From the National Comorbidity Survey-Replication. *Headache.* 2015;55(10):1323-41.

120. Breslau N, Kessler RC, Chilcoat HD, Schultz LR, Davis GC, Andreski P. Trauma and posttraumatic stress disorder in the community: the 1996 Detroit Area Survey of Trauma. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55(7):626-32.
121. Reynolds K, Pietrzak RH, Mackenzie CS, Chou KL, Sareen J. Post-Traumatic Stress Disorder Across the Adult Lifespan: Findings From a Nationally Representative Survey. *Am J Geriatr Psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry*. 2016;24(1):81-93.
122. Tietjen GE, Khubchandani J, Herial NA, Shah K. Adverse childhood experiences are associated with migraine and vascular biomarkers. *Headache*. 2012;52(6):920-9.
123. Lee S, Tsang A, Von Korff M, de Graaf R, Benjet C, Haro JM, et al. Association of headache with childhood adversity and mental disorder: cross-national study. *Br J Psychiatry J Ment Sci*. 2009;194(2):111-6.
124. Yehuda R, Flory JD, Bierer LM, Henn-Haase C, Lehrner A, Desarnaud F, et al. Lower methylation of glucocorticoid receptor gene promoter 1F in peripheral blood of veterans with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2015;77(4):356-64.
125. Jakovcevski M, Akbarian S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med*. 2012;18(8):1194-204.
126. Tronick E, Hunter RG. Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Front Behav Neurosci*. 2016;10:107.
127. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. *Science*. 2010;330(6004):612-6.
128. Yan H, Tian S, Slager SL, Sun Z, Ordog T. Genome-Wide Epigenetic Studies in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol*. 2016;183(2):96-109.
129. Johnson TB, Coghill RD. RESEARCHES ON PYRIMIDINES. C111. THE DISCOVERY OF 5-METHYL-CYTOSINE IN TUBERCULINIC ACID, THE NUCLEIC ACID OF THE TUBERCLE BACILLUS1. *J Am Chem Soc*. 1925;47(11):2838-44.
130. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):253-62.
131. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS One*. 2011;6(1):e14524.
132. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484-92.
133. Turker MS. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene*. 2002;21(35):5388-93.
134. Stadler MB, Murr R, Burger L, Ivanek R, Lienert F, Schöler A, et al. DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature*. 2011;480(7378):490-5.
135. El-Maarri O, Kareta MS, Mikeska T, Becker T, Diaz-Lacava A, Junen J, et al. A systematic search for DNA methyltransferase polymorphisms reveals a rare DNMT3L variant associated with subtelomeric hypomethylation. *Hum Mol Genet*. 2009;18(10):1755-68.

136. Philibert RA, Sandhu H, Hollenbeck N, Gunter T, Adams W, Madan A. The relationship of 5HTT (SLC6A4) methylation and genotype on mRNA expression and liability to major depression and alcohol dependence in subjects from the Iowa Adoption Studies. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2008;147B(5):543-9.
137. Hannon E, Lunnon K, Schalkwyk L, Mill J. Interindividual methylomic variation across blood, cortex, and cerebellum: implications for epigenetic studies of neurological and neuropsychiatric phenotypes. *Epigenetics*. 2015;10(11):1024-32.
138. Montagna P. The primary headaches: genetics, epigenetics and a behavioural genetic model. *J Headache Pain*. 2008;9(2):57-69.
139. Eising E, A Datson N, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD. Epigenetic mechanisms in migraine: a promising avenue? *BMC Med*. 2013;11:26.
140. Park K-Y, Fletcher JR, Raddant AC, Russo AF. Epigenetic regulation of the calcitonin gene-related peptide gene in trigeminal glia. *Cephalalgia Int J Headache*. 2011;31(5):614-24.
141. Labruijere S, Stolk L, Verbiest M, de Vries R, Garrelds IM, Eilers PHC, et al. Methylation of migraine-related genes in different tissues of the rat. *PloS One*. 2014;9(3):e87616.
142. Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang M-H, Bonaguidi MA, et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci*. 2011;14(10):1345-51.
143. Wan D, Hou L, Zhang X, Han X, Chen M, Tang W, et al. DNA methylation of RAMP1 gene in migraine: an exploratory analysis. *J Headache Pain*. 2015;16(1):90.
144. Gerring ZF, McRae AF, Montgomery GW, Nyholt DR. Genome-wide DNA methylation profiling in whole blood reveals epigenetic signatures associated with migraine. *BMC Genomics*. 2018;19(1):69.
145. Winsvold BS, Palta P, Eising E, Page CM, International Headache Genetics Consortium, van den Maagdenberg AM, et al. Epigenetic DNA methylation changes associated with headache chronification: A retrospective case-control study. *Cephalalgia Int J Headache*. 2018;38(2):312-22.
146. Terlizzi R, Bacalini MG, Pirazzini C, Giannini G, Pierangeli G, Garagnani P, et al. Epigenetic DNA methylation changes in episodic and chronic migraine. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2018;39(Suppl 1):67-8.
147. Sacco S, Braschinsky M, Ducros A, Lampl C, Little P, van den Brink AM, et al. European headache federation consensus on the definition of resistant and refractory migraine : Developed with the endorsement of the European Migraine & Headache Alliance (EMHA). *J Headache Pain*. 2020;21(1):76.
148. Kajimura S. Promoting brown and beige adipocyte biogenesis through the PRDM16 pathway. *Int J Obes Suppl*. 2015;5(Suppl 1):S11-14.
149. Bigal ME, Lipton RB. Putative mechanisms of the relationship between obesity and migraine progression. *Curr Pain Headache Rep*. 2008;12(3):207-12.

150. Nguyen H-L, Lee YJ, Shin J, Lee E, Park SO, McCarty JH, et al. TGF- β signaling in endothelial cells, but not neuroepithelial cells, is essential for cerebral vascular development. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2011;91(11):1554-63.
151. Diniz LP, Matias I, Siqueira M, Stipursky J, Gomes FCA. Astrocytes and the TGF- β 1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword. *Mol Neurobiol*. 2019;56(7):4653-79.
152. Schürks M, Kurth T, Buring JE, Zee RYL. A candidate gene association study of 77 polymorphisms in migraine. *J Pain*. 2009;10(7):759-66.
153. Gasparini CF, Sutherland HG, Maher B, Rodriguez-Acevedo AJ, Khelifi E, Haupt LM, et al. Case-control study of ADARB1 and ADARB2 gene variants in migraine. *J Headache Pain*. 2015;16:511.
154. Flavell SW, Kim T-K, Gray JM, Harmin DA, Hemberg M, Hong EJ, et al. Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron*. 2008;60(6):1022-38.
155. Law C, Bunyan D, Castle B, Day L, Simpson I, Westwood G, et al. Clinical features in a family with an R460H mutation in transforming growth factor beta receptor 2 gene. *J Med Genet*. 2006;43(12):908-16.
156. Urbach A, Bruehl C, Witte OW. Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *Eur J Neurosci*. 2006;24(3):841-56.
157. Buhler AV, Choi J, Proudfit HK, Gebhart GF. Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain*. 2005;114(1-2):285-94.
158. Oterino A, Pascual J, Ruiz de Alegría C, Valle N, Castillo J, Bravo Y, et al. Association of migraine and ESR1 G325C polymorphism. *Neuroreport*. 2006;17(1):61-4.
159. Fischer M, Wille G, Klien S, Shanib H, Holle D, Gaul C, et al. Brain-derived neurotrophic factor in primary headaches. *J Headache Pain*. 2012;13(6):469-75.
160. Lipton RB, Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Silberstein S, Reed ML, et al. Cutaneous allodynia in the migraine population. *Ann Neurol*. 2008;63(2):148-58.
161. Chaudhuri A, Behan PO. Fatigue in neurological disorders. *Lancet Lond Engl*. 2004;363(9413):978-88.
162. Lucchesi C, Sassi AN, Siciliano G, Gori S. Fatigue is increased in episodic migraine without aura patients. *Headache*. 2013;53(7):1163-5.
163. Lucchesi C, Baldacci F, Cafalli M, Dini E, Giampietri L, Siciliano G, et al. Fatigue, sleep-wake pattern, depressive and anxiety symptoms and body-mass index: analysis in a sample of episodic and chronic migraine patients. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2016;37(6):987-9.

164. Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol*. 1989;46(10):1121-3.
165. Stewart WF, Lipton RB, Whyte J, Dowson A, Kolodner K, Liberman JN, et al. An international study to assess reliability of the Migraine Disability Assessment (MIDAS) score. *Neurology*. 1999;53(5):988-94.
166. Kosinski M, Bayliss MS, Bjorner JB, Ware JE, Garber WH, Batenhorst A, et al. A six-item short-form survey for measuring headache impact: the HIT-6. *Qual Life Res Int J Qual Life Asp Treat Care Rehabil*. 2003;12(8):963-74.
167. Ware J, Kosinski M, Keller SD. A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Med Care*. 1996;34(3):220-33.
168. Vilagut G, María Valderas J, Ferrer M, Garin O, López-García E, Alonso J. Interpretación de los cuestionarios de salud SF-36 y SF-12 en España: componentes físico y mental. *Med Clínica*. 2008;130(19):726-35.
169. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry*. 1998;59 Suppl 20:22-33;quiz 34-57.
170. Davidson J, Smith R. Traumatic experiences in psychiatric outpatients. *J Trauma Stress*. 1990;3(3):459-75.
171. Bobes J, Calcedo-Barba A, García M, François M, Rico-Villademoros F, González MP, et al. [Evaluation of the psychometric properties of the Spanish version of 5 questionnaires for the evaluation of post-traumatic stress syndrome]. *Actas Esp Psiquiatr*. 2000;28(4):207-18.
172. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1961;4:561-71.
173. Richter P, Werner J, Heerlein A, Kraus A, Sauer H. On the validity of the Beck Depression Inventory. A review. *Psychopathology*. 1998;31(3):160-8.
174. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol*. 1988;56(6):893-7.
175. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9821-6.
176. Li L-C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinforma Oxf Engl*. 2002;18(11):1427-31.
177. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001;25(4):402-8.

178. Hu Z, Yang Y, Zhao Y, Yu H, Ying X, Zhou D, et al. APOE hypermethylation is associated with autism spectrum disorder in a Chinese population. *Exp Ther Med*. 2018;15(6):4749-54.
179. Lioznova AV, Khamis AM, Artemov AV, Besedina E, Ramensky V, Bajic VB, et al. CpG traffic lights are markers of regulatory regions in human genome. *BMC Genomics* [Internet]. 2019 [citado 12 de julio de 2019];20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6359853/>
180. Mehta D, Klengel T, Conneely KN, Smith AK, Altmann A, Pace TW, et al. Childhood maltreatment is associated with distinct genomic and epigenetic profiles in posttraumatic stress disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(20):8302-7.
181. Ran C, Fourier C, Zinnegger M, Steinberg A, Sjöstrand C, Waldenlind E, et al. Implications for the migraine SNP rs1835740 in a Swedish cluster headache population. *J Headache Pain*. 2018;19(1):100.
182. Benbow T, Cairns BE. Dysregulation of the peripheral glutamatergic system: A key player in migraine pathogenesis? *Cephalalgia Int J Headache*. 2021;41(11-12):1249-61.
183. Peeters M, Gunthorpe MJ, Strijbos PJLM, Goldsmith P, Upton N, James MF. Effects of pan- and subtype-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on cortical spreading depression in the rat: therapeutic potential for migraine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(2):564-72.
184. Andreou AP, Edvinsson L. Mechanisms of migraine as a chronic evolutive condition. *J Headache Pain*. 2019;20(1):117.
185. Cargnin S, Viana M, Sances G, Tassorelli C, Terrazzino S. A systematic review and critical appraisal of gene polymorphism association studies in medication-overuse headache. *Cephalalgia Int J Headache*. 2018;38(7):1361-73.
186. Diener H-C, Dodick D, Evers S, Holle D, Jensen RH, Lipton RB, et al. Pathophysiology, prevention, and treatment of medication overuse headache. *Lancet Neurol*. 2019;18(9):891-902.
187. Matak I, Bölskei K, Bach-Rojecky L, Helyes Z. Mechanisms of Botulinum Toxin Type A Action on Pain. *Toxins*. 2019;11(8).
188. Hoffmann J, Charles A. Glutamate and Its Receptors as Therapeutic Targets for Migraine. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2018;15(2):361-70.
189. González-Quintanilla V, Toriello M, Palacio E, González-Gay MA, Castillo J, Montes S, et al. Systemic and cerebral endothelial dysfunction in chronic migraine. A case-control study with an active comparator. *Cephalalgia Int J Headache*. 2016;36(6):552-60.
190. Tietjen GE. Migraine as a systemic vasculopathy. *Cephalalgia Int J Headache*. 2009;29(9):987-96.
191. Kleczkowska P, Lipkowski AW. Neurotensin and neurotensin receptors: characteristic, structure-activity relationship and pain modulation--a review. *Eur J Pharmacol*. 2013;716(1-3):54-60.

192. Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* 2002;25(6):319-25.
193. Welch KM, Nagesh V, Aurora SK, Gelman N. Periaqueductal gray matter dysfunction in migraine: cause or the burden of illness? *Headache.* 2001;41(7):629-37.
194. Sánchez del Río González M. Migraña crónica: fisiopatología. *Rev Neurol.* 2012;54(S02):13.
195. Tyrka AR, Price LH, Marsit C, Walters OC, Carpenter LL. Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults. *PloS One.* 2012;7(1):e30148.
196. Labonté B, Azoulay N, Yerko V, Turecki G, Brunet A. Epigenetic modulation of glucocorticoid receptors in posttraumatic stress disorder. *Transl Psychiatry.* 2014;4:e368.
197. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv.* 2016;2(7):e1600584.
198. Jaffe AE, Gao Y, Deep-Soboslay A, Tao R, Hyde TM, Weinberger DR, et al. Mapping DNA methylation across development, genotype and schizophrenia in the human frontal cortex. *Nat Neurosci.* 2016;19(1):40-7.
199. Huynh JL, Garg P, Thin TH, Yoo S, Dutta R, Trapp BD, et al. Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nat Neurosci.* 2014;17(1):121-30.
200. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature.* 2015;517(7534):321-6.
201. Otis JD, Keane TM, Kerns RD. An examination of the relationship between chronic pain and post-traumatic stress disorder. *J Rehabil Res Dev.* 2003;40(5):397-405.
202. Muse M. Stress-related, posttraumatic chronic pain syndrome: behavioral treatment approach. *Pain.* 1986;25(3):389-94.
203. Olaya B, Alonso J, Atwoli L, Kessler RC, Vilagut G, Haro JM. Association between traumatic events and post-traumatic stress disorder: results from the ESEMeD-Spain study. *Epidemiol Psychiatr Sci.* 2015;24(2):172-83.
204. Sachs-Ericsson NJ, Sheffler JL, Stanley IH, Piazza JR, Preacher KJ. When Emotional Pain Becomes Physical: Adverse Childhood Experiences, Pain, and the Role of Mood and Anxiety Disorders. *J Clin Psychol.* 2017;73(10):1403-28.
205. Tietjen GE, Peterlin BL. Childhood abuse and migraine: epidemiology, sex differences, and potential mechanisms. *Headache.* 2011;51(6):869-79.
206. Tietjen GE, Herial NA, Hardgrove J, Utley C, White L. Migraine comorbidity constellations. *Headache.* 2007;47(6):857-65.
207. King SB, Toufexis DJ, Hammack SE. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), stress, and sex hormones. *Stress Amst Neth.* 2017;20(5):465-75.

208. Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, et al. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*. 2011;470(7335):492-7.
209. Di Giacinto A, Brunetti M, Sepede G, Ferretti A, Merla A. Thermal signature of fear conditioning in mild post traumatic stress disorder. *Neuroscience*. 2014;266:216-23.
210. Riesco N, Pérez-Alvarez AI, Verano L, García-Cabo C, Martínez-Ramos J, Sánchez-Lozano P, et al. Prevalence of cranial autonomic parasympathetic symptoms in chronic migraine: Usefulness of a new scale. *Cephalalgia Int J Headache*. 2016;36(4):346-50.
211. Riesco N, Cernuda-Morollón E, Pascual J. Neuropeptides as a Marker for Chronic Headache. *Curr Pain Headache Rep*. 2017;21(4):18.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

9.1 COMITÉ DE ÉTICA



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA IDIVAL



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Modificaciones epigenéticas inducidas por experiencias adversas infantiles y daño endotelial en la migraña crónica: estudio de casos y controles. Creación de modelo experimental murino.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2015.155)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal el Dr. **AGUSTÍN OTERINO DURÁN**.

Como queda reflejado en el Acta: **8/2017**.

Lo que firmo en Santander, a **30 de agosto de 2017**

T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretario/a del CEIC



9.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE.

TÍTULO DEL ESTUDIO: Modificaciones epigenéticas inducidas por experiencias adversas infantiles y daño endotelial en la migraña crónica: estudio de casos y controles. Creación de modelo experimental murino

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Agustín Oterino Durán

CENTROS IMPLICADOS: HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA y HOSPITAL GENERAL DE BURGOS.

Motivación del estudio:

Este estudio está fundamentado en la hipótesis de que la migraña se cronifica especialmente en los casos que han sufrido algún tipo de trauma psíquico o físico, especialmente en edades tempranas de la vida, pero no de forma exclusiva. Así, haber sufrido malos tratos, humillaciones en el hogar, en casa o acoso escolar, abusos deshonestos, traumatismos graves ya sean de tráfico o de otro tipo, haber presenciado escenas muy violentas que pueden o no haber afectado a personas queridas o cercanas, se ha demostrado que son más frecuentes en las personas que sufren migraña crónica. Estos estudios han sido realizados en EEUU, principalmente, y creemos que pueden estar jugando un papel crítico también en nuestros pacientes.

¿Qué información es necesaria para el estudio?

Este estudio requiere que nos responda a las cuestiones propias de su cefalea, como se haría en la práctica diaria. Adicionalmente, se le pasarán las escalas y cuestionarios que nos darán información del impacto de la migraña en su calidad de vida, de las experiencias potencialmente traumáticas vividas por Ud y de qué forma le están o no afectando en la actualidad, así como los tratamientos que Ud ha seguido para la misma. Se le dará un dossier con todos estos formularios.

¿Por qué se piden muestras de ADN y de ARN y de suero?

Estas muestras se le piden a Ud porque es sabido que las experiencias vividas pueden modificar nuestro ADN en forma de alteraciones que afectan a la expresión de determinados genes. De esta forma, y hay genes especialmente sensibles a estas alteraciones, las respuestas biológicas ante determinados estímulos se producen de una forma más rápida, más intensa, involucrando a estructuras del cerebro o del sistema endocrino de modo inmediato ante mínimos estímulos. Creemos que el desarrollo de los fenómenos cerebrales que se suceden en la crisis de migraña se desencadenan de forma mucho más fácil en pacientes que han tenido este tipo de experiencias traumáticas. Nosotros analizaremos esos genes y la proporción de metilación de las regiones que los regulan y los correlacionaremos con las características particulares de la migraña de cada paciente.

Las muestras serán codificadas, guardadas en una base de datos encriptada a la que tendrán acceso sólo los miembros del estudio, con permiso del I.P.

¿Por qué se realiza una ecografía craneal, tiene algún riesgo?

La ecografía es una prueba inocua para el ser humano, se realiza a los fetos en el vientre de la madre.

Realizaremos una ecografía a determinados pacientes, no a todos, con el objeto de valorar la reactividad de los vasos cerebrales, hecho que nuestro grupo ha demostrado que está en relación con la gravedad de la migraña.

Todas las pruebas se realizarán en ayunas.

¿De qué forma afectará participar en este estudio al manejo de mi patología?

La rutina de los servicios de neurología en lo referente al manejo de los pacientes con cefaleas graves o crónicas implica la realización de una historia clínica, de pruebas específicas que se consideren según el caso, la prescripción de las medicaciones que el médico que le atienda considere oportuno. Y se hará un seguimiento como sea oportuno en la práctica clínica diaria.

En este sentido, su participación en el estudio le alterará en lo referente a la realización de las pruebas de ecografía y muestras de sangre. Entre ellas, se solicitará el perfil de colesterol y lípidos y marcadores de inflamación que son de rutina en estos casos, además de las necesarias para extraer ADN y ARN. Ni el tratamiento, ni las pruebas de imagen que su médico considere oportuno, se verán influenciados por participar en el estudio.

Además del tratamiento según la guía de cefaleas actual vigente publicada por la Sociedad Española de Neurología, nosotros le propondremos ser tratado por el grupo de Psicología Clínica del Hospital, según sus protocolos clínicos vigentes, con objeto de ofrecerle una herramienta de tratamiento novedosa, pero que se ha mostrado eficaz en el manejo del dolor crónico, en el caso de que Ud no mejore con los tratamientos de uso en práctica clínica diaria o esté sufriendo estrés postraumático. Los resultados de las intervenciones psicológicas se incluirán en el registro de sus datos clínicos y biológicos.

Dado que el tratamiento psicológico es práctica clínica habitual en nuestro centro, se le solicitará su permiso si procede tal tratamiento y se hará constar en la historia clínica como cualquier otro tratamiento al uso.

Requisitos legales.

Este proyecto cumple con la legalidad vigente en materia de:

- Protección de datos de carácter personal, según la Ley Orgánica 15 /1999, de 13 de diciembre, por la cual sus datos se correlacionarán con los datos obtenidos de forma confidencial y en relación con los objetivos proyectados.
- Carácter altruista de la participación de pacientes y controles sanos y de la titularidad de los resultados científicos obtenidos, que recae en el investigador, según ley vigente de investigación biomédica 14/2007. Sus muestras se mantendrán durante el tiempo que dure el proyecto. En el caso de requerir nuevas investigaciones, se le solicitaría su consentimiento, de lo contrario se destruirán pasados 10 años.
- Acuerdos de Helsinki sobre materia de investigación en humanos más reciente.

Información sobre los resultados del estudio.

No le informaremos directamente de los resultados del estudio en materia de genética o de análisis que no sean trascendentes para Ud.

No obstante, hay ciertos aspectos que sí pueden a priori serle útiles:

- Si en los análisis de rutina observamos alteraciones relevantes para Ud
- SI en los estudios de ecografía observamos datos patológicos que se vieran ser manejados clínicamente.

En estos casos, se obrará conforme práctica clínica habitual.

Por último, el equipo de investigación le agradece su participación en este estudio.

Teléfonos de contacto:

- 942202507, consulta de neurología
- Busca de cefaleas: 618251309
- Email del IP: abajo indicado

Coordinador del proyecto:

Dr Agustín Oterino Durán

Servicio de Neurología

Unidad de Cefaleas y Esclerosis Múltiple

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

agustin.oterino@gmail.com

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Modificaciones epigenéticas inducidas por experiencias adversas infantiles y daño endotelial en la migraña crónica: estudio de casos y controles. Creación de modelo experimental murino

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Agustín Oterino Durán

CENTROS IMPLICADOS: HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA y HOSPITAL GENERAL DE BURGOS.

D./Dña. _____
(Nombre y apellidos del paciente en MAYÚSCULAS)

He leído y comprendido la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio arriba indicado.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He realizado todas las preguntas que he precisado sobre el estudio.

He hablado con: con quien he clarificado las posibles dudas.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio o solicitar que mis datos sean borrados y mis muestras de sangre y ADN destruidas:

- Cuando quiera
- Sin dar explicaciones
- Sin que repercuta en mis cuidados médicos.

Comprendo que la información personal que aporte será confidencial y sólo se presentará de forma anónima en publicaciones y reuniones de carácter científico.

Comprendo que mi participación en el estudio implica autorizar:

1. La extracción de muestras de sangre 20 mL de sangre para obtener suero, ADN y ARN.
2. La realización si procediera de una ecografía transcraneal según el procedimiento descrito en la hoja de información al paciente.

Y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del investigador

Firma del paciente

Fecha _____

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. _____ retiro
el consentimiento otorgado para mi participación en el estudio arriba citado.

Fecha y firma:

9.3 ESCALAS Y CUESTIONARIOS

ESCALA DE ALODINIA CUTÁNEA

Cuán a menudo experimenta un incremento del dolor o una sensación desagradable en la piel durante las cefaleas cuando Ud hace una de las siguientes acciones:	No me es aplicable	Nunca	Raramente	Menos de la mitad del tiempo	La mitad del tiempo o más
Puntuación	0	0	0	1	2
Peinar el pelo					
Hacer una coleta					
Afeitarse la cara					
Llevar gafas					
Llevar lentillas					
Llevar bufanda					
Llevar ropa apretada					
Ducharse (cuando el agua le golpea la cara o la cabeza)					
Exponerse a fuentes de calor (cocina, hoguera, radiador)					
Exponerse al frío (bloque de hielo, lavarse con agua fría)					

SÍNTOMAS AUTONÓMICOS RELACIONADOS CON LA CEFALEA

¿Ha apreciado alguno de los siguientes síntomas antes o justo con el dolor más intenso en la cara, en el mismo lado que más le duele? Entienda que se refiere exclusivamente con el dolor de cabeza.

	Nunca	Alguna vez	A menudo
Sensación de plenitud en la cara o en el ojo			
Lagrimo			
Enrojecimiento de la cara			
Enrojecimiento del ojo			
¿Se le cae el párpado?			
¿Tiene sensación de arenilla en el ojo?			

¿Se le coge la nariz por una o las dos fosas nasales?			
¿Tiene rinorrea; le gotea la nariz?			

ESCALA DE SEVERIDAD DE LA FATIGA

Durante la pasada semana ha encontrado que:	Completamente en desacuerdo			Ni de acuerdo ni en desacuerdo			Completamente de acuerdo
1. Mi motivación es menor cuando estoy fatigado	1	2	3	4	5	6	7
2. El ejercicio me hace que esté fatigado	1	2	3	4	5	6	7
3. Me fatigo fácilmente	1	2	3	4	5	6	7
4. La fatiga interfiere en mi funcionamiento físico	1	2	3	4	5	6	7
5. La fatiga me causa problemas frecuentemente	1	2	3	4	5	6	7
6. La fatiga me impide un funcionamiento físico prolongado	1	2	3	4	5	6	7
7. La fatiga interfiere en llevar a cabo algunas labores y responsabilidades	1	2	3	4	5	6	7
8. La fatiga está entre uno de los síntomas que más me invalidan	1	2	3	4	5	6	7
9. La familia interfiere en mi trabajo, familia y vida social	1	2	3	4	5	6	7

MIGRAINE DISSABILITY ASESMENT SCORE (MIDAS)

1.¿Cuántos días en los últimos 3 meses no ha podido ir a trabajar por cefalea?
2.¿Cuántos días en los últimos 3 meses redujo a la mitad su productividad en el trabajo por cefalea?
3.¿Cuántos días en los últimos 3 meses no ha realizado sus tareas domésticas por cefalea?
4.¿Cuántos días en los últimos 3 meses redujo a la mitad su productividad en las tareas domésticas por cefalea?
5.¿Cuántos días en los últimos 3 meses se perdió actividades familiares, sociales o lúdicas por cefalea?

HEADACHE IMPACT TEST (HIT-6)

1.Cuando usted tiene dolor de cabeza, ¿con qué frecuencia es intenso? Nunca Pocas veces A veces Muy a menudo Siempre
2. ¿Con qué frecuencia el dolor de cabeza limita su capacidad para realizar actividades diarias habituales como las tareas domésticas, el trabajo, los estudios o actividades sociales? Nunca Pocas veces A veces Muy a menudo Siempre
3.Cuando tiene dolor de cabeza, ¿con qué frecuencia le gustaría poder acostarse? Nunca Pocas veces A veces Muy a menudo Siempre
4.En las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia se ha sentido demasiado cansado/a para trabajar o realizar las actividades diarias debido al dolor de cabeza? Nunca Pocas veces A veces Muy a menudo Siempre
5.En las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia se ha sentido harto/a o irritado/a debido a su dolor de cabeza? Nunca Pocas veces A veces Muy a menudo Siempre
6.En las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia el dolor de cabeza ha limitado su capacidad para concentrarse en el trabajo o en las actividades diarias? Nunca Pocas veces A veces Muy a menudo Siempre

MINI ENTREVISTA NEUROPSIQUIÁTRICA INTERNACIONAL

MINI Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional		
F.Estado por estrés postraumático		
I.1. ¿Ha vivido o ha sido testigo de algún acontecimiento extremadamente traumático, en el cuál otras personas han muerto y/u otras personas o usted mismo han estado amenazadas de muerte o en su integridad física?	NO	SÍ
I.2. ¿Durante el pasado mes ha revivido el evento de una manera angustiosa (p.ej., lo ha soñado, ha tenido imágenes vívidas, ha reaccionado físicamente o ha tenido memorias intensas)?	NO	SÍ
I.3. En el último mes:		
• ¿Ha evitado usted pensar en este acontecimiento, o en todo aquello que se lo pudiese recordar?	NO	SÍ
• ¿Ha tenido dificultad recordando alguna parte del evento?	NO	SÍ
• ¿Ha disminuido su interés en las cosas que le agradaban o en las actividades sociales?	NO	SÍ
• ¿Se ha sentido usted alejado o distante de otros?	NO	SÍ
• ¿Ha notado que sus sentimientos están adormecidos?	NO	SÍ
• ¿Ha tenido la impresión de que su vida se va a acortar debido a este trauma o que va a morir antes que otras personas?	NO	SÍ

➡ ¿CODIFICÓ SÍ EN 3 O MÁS RESPUESTAS DE I.3.?	NO	SÍ
I.4 Durante el último mes • ¿Ha tenido usted dificultades para dormir? • ¿Ha estado particularmente irritable o le daban ataques de coraje? • ¿Ha tenido dificultad para concentrarse? • ¿Ha estado nervioso o constantemente en alerta? • ¿Se ha sobresaltado fácilmente por cualquier cosa? ➡ ¿CODIFICÓ SÍ EN 2 O MÁS RESPUESTAS DE I.4.?	NO NO NO NO NO NO NO	SÍ SÍ SÍ SÍ SÍ SÍ SÍ
I.5 ¿En el transcurso de este mes, han interferido estos problemas en su trabajo, en sus actividades sociales o han sido causa de gran ansiedad?	NO	SÍ ESTADO POR ESTRÉS POSTRAUMÁTICO ACTUAL

CUESTIONARIO PARA EXPERIENCIAS TRAUMÁTICAS (TQ)

Acontecimiento		Edad (cuando ocurrió el suceso)	Duración (unidad de tiempo: minutos, horas, etc)
1.Accidente de coche, tren o avión	No/Sí		
2.Accidente industrial o de trabajo	No/Sí		
3.Pérdida del hogar por incendio	No/Sí		
4.Pérdida del hogar o de un miembro familiar por inundaciones	No/Sí		
5.Pérdida del hogar o de un miembro familiar por un tornado o huracán	No/Sí		
6.Pérdida del hogar o de un miembro familiar por un terremoto	No/Sí		
7.Amenaza seria o daño a un miembro de la familia o amigo íntimo	No/Sí		
8.Muerte inesperada de un	No/Sí		

miembro de la familia o amigo íntimo			
9.Estar próximo a ahogarse	No/Sí		
10.Abuso físico	No/Sí		
11.Sufrir quemaduras graves	No/Sí		
12.Ser tomado como rehén	No/Sí		
13.Combate	No/Sí		
14.Agresión	No/Sí		
15.Violación	No/Sí		
16.Incesto	No/Sí		
17.Secuestro	No/Sí		
18.Otros	No/Sí		

Si no ha experimentado ninguna de las situaciones anteriores, no necesita responder las preguntas que están a continuación. Si ha experimentado uno o más de los acontecimientos anteriores, seleccione el que le resulte más desagradable recordar ahora.	
ACONTECIMIENTO:	
1.¿Estaba preparado para el suceso?	No/Sí
2.El acontecimiento, ¿supuso miedo, espanto, vergüenza, asco o disgusto para usted? En caso afirmativo, por favor subraye la/s palabra/s apropiada/s.	No/Sí
3.¿Sufrió lesiones físicas por este acontecimiento?	No/Sí
4.¿Pensó que su vida estaba en peligro?	No/Sí
5.¿Estuvo sólo durante algún momento de esa situación?	No/Sí
6.¿Tenía la sensación de que podía hacer algo para detener la situación?	No/Sí

7.¿Se ha sentido diferente de otras personas debido al acontecimiento?	No/Sí
8.¿Ha hablado alguna vez con alguien a cerca del acontecimiento?	No/Sí
9.En caso negativo, ¿sintió alguna vez que le gustaría hacerlo?	No/Sí
Después del acontecimiento que ha experimentado, algunas personas a veces experimentan síntomas desagradables. Cada síntoma se describe a continuación. Por favor, indique si ha notado o no alguno de ellos en cualquier momento después del suceso.	No/Sí
1.Pesadillas acerca del acontecimiento o en relación con el tema.	No/Sí
2.Actuar como si estuviera otra vez en la misma situación.	No/Sí
3.Estar nervioso o fácilmente asustado.	No/Sí
4.Sentir como si tuviera que permanecer en guardia.	No/Sí
5.Dificultad para dormir.	No/Sí
6.Problemas de concentración.	No/Sí
7.Experimentar menos sentimientos hacia las personas que normalmente tiene cariño.	No/Sí
8.Pérdida de interés/placer en cosas que antes del suceso tenían importancia para usted.	No/Sí
9.Sentirse avergonzado de estar todavía vivo tras el acontecimiento.	No/Sí
10.Evitar hacer algo que le recuerde al suceso.	No/Sí
11.Evitar pensamientos o sentimientos asociados con el suceso.	No/Sí
12.Tener imágenes dolorosas y recuerdos recurrentes del suceso.	No/Sí
13.Los recuerdos le producen ansiedad, tristeza, enfado, irritabilidad o temor.	No/Sí
14.No poder recordar una parte importante del suceso.	No/Sí
15.Sentir pesimismo sobre el futuro, que no lo sentía antes del suceso.	No/Sí
16.Sentirse más irritable, o fácilmente molesto, o tuvo ataques de enfado que no tenía antes del suceso.	No/Sí

10. Experimentar síntomas físicos cuando se expone a un recuerdo: sudoración, temblor, palpitaciones, náuseas, respiración acelerada, mareos.	No/Sí
11. Sentirse distanciado o alejado de la gente.	No/Sí
¿Ha visitado al médico alguna vez para el tratamiento de síntomas causados por el suceso?	No/Sí
¿Ha sido hospitalizado alguna vez como consecuencia directa del acontecimiento?	No/Sí

INVENTARIO DE DEPRESIÓN DE BECK (BDI)

1. 0. No me siento triste 1.Me siento triste 2.Me siento triste continuamente 3.Me siento tan triste o tan desgraciado que no puedo soportarlo
2. 0. No me siento especialmente desanimado respecto al futuro 1.Me siento desanimado respecto al futuro 2.Siento que no tengo que esperar nada 3.Siento que el futuro es desesperanzador y que las cosas no van a mejorar
3. 0. No me siento fracasado 1.Creo que he fracasado más que la mayoría de las personas 2.Cuando miro hacia atrás sólo veo fracaso tras fracaso. 3.Me siento una persona totalmente fracasada.
4. 0. Las cosas me satisfacen tanto como antes 1.No disfruto de las cosas tanto como antes 2.Ya no tengo una satisfacción auténtica de las cosas 3.Estoy insatisfecho o aburrido de todo
5. 0. No me siento especialmente culpable 1.Me siento culpable en bastantes ocasiones 2.Me siento culpable en la mayoría de las situaciones 3.Me siento culpable constantemente
6. 0. Creo que no estoy siendo castigado 1.Siento que puedo ser castigado

2.Espero ser castigado
3.Siento que estoy siendo castigado
4.Quiero que me castiguen
7. 0. No me siento descontento conmigo mismo
1.Estoy descontento conmigo mismo
2.Me avergüenzo de mí mismo
3.Me odio
8. 0. No me considero peor que cualquier otra persona
1.Me autocrítico por mis debilidades o por mis errores
2.Continuamente me culpo por mis faltas
3.Me culpo de todo lo malo que sucede
9. 0. No tengo ningún pensamiento de suicidio
1.A veces pienso en suicidarme, pero no lo haría
2.Desearía suicidarme
3.Me suicidaría si tuviese la oportunidad
10. 0. No lloro más de lo que solía
1.Me molesto o irrito más fácilmente que antes
2.Me siento irritado continuamente
3.No me irrito absolutamente nada por las cosas que antes solían irritarme
11. 0. No estoy más irritado de lo normal en mí
1.Me molesto o irrito más fácilmente que antes
2.Me siento irritado continuamente
3.No me irrito absolutamente nada por las cosas que antes solían irritarme
12. 0. No he perdido el interés por los demás
1.Estoy menos interesado en los demás que antes
2.He perdido la mayor parte de mi interés por los demás
3.He perdido todo el interés por los demás
13. 0. Tomo decisiones más o menos como siempre he hecho
1.Evito tomar decisiones más que antes
2.Tomar decisiones me resulta mucho más difícil que antes
3.Ya me es imposible tomar decisiones
14. 0. No creo tener peor aspecto que antes

1.Estoy preocupado porque parezca mayor o poco atractivo
2.Creo que se han producido cambios permanentes en mi aspecto que me hacen parecer poco atractivo
3.Creo que tengo un aspecto horrible
15. 0. Trabajo igual que antes
1.Me cuesta un esfuerzo extra comenzar a hacer algo
2.Tengo que obligarme mucho para hacer algo
3.No puedo hacer nada en absoluto
16. 0. Duermo tan bien como siempre
1.No duermo tan bien como antes
2.Me despierto una o dos horas antes de lo habitual y me resulta difícil volver a dormir
3.Me despierto varias horas antes de lo habitual y me cuesta volver a dormir
17. 0. No me siento más cansado de lo normal
1.Me canso más fácilmente que antes
2.Me canso en cuanto hago cualquier cosa
3.Estoy demasiado cansado para hacer nada
18. 0. Mi apetito no ha disminuido
1.No tengo tanto buen apetito como antes
2.Ahora tengo mucho menos apetito
3.He perdido completamente el apetito
19. 0. Últimamente he perdido poco peso o no he perdido nada
1.He perdido más de 2 kilos y medio
2.He perdido más de 4 kilos
3.He perdido más de 7 kilos
Estoy a dieta para adelgazar: SI/NO
20. 0. No estoy preocupado por mi salud más de lo habitual
1.Estoy preocupado por problemas físicos como dolores, molestias, malestar de estómago o estreñimiento
2.Estoy preocupado por mis problemas físicos y me resulta difícil pensar en algo más

3.Estoy tan preocupado por mis problemas físicos que soy incapaz de pensar en cualquier otra cosa
21. 0. No he observado ningún cambio reciente en mi interés por el sexo
1.Estoy menos interesado por el sexo que antes
2.Ahora estoy mucho menos interesado por el sexo
3.He perdido totalmente mi interés por el sexo

INVENTARIO DE ANSIEDAD DE BECK (BAI)

	En absoluto (0)	Levemente (1)	Moderadamente (2)	Severamente (3)
1. Torpe o entumecido				
2.Acalorado				
3.Con temblor en las piernas				
4.Incapaz de relajarse				
5.Con temor a que ocurra lo peor				
6.Mareado, o que se le va la cabeza				
7.Con latidos del corazón fuertes y acelerados				
8.Inestable				
9.Atemorizado o asustado				
10.Nervioso				
11.Con sensación de bloqueo				
12.Con temblores en las manos				
13.Inquieto, inseguro				

14.Con miedo a perder el control				
15.Con sensación de ahogo				
16.Con temor a morir				
17.Con miedo				
18.Con problemas digestivos				
19.Con desvanecimientos				
20.Con rubor facial				
21.Con sudores fríos o calientes				

CUESTIONARIO DE SALUD SF-12

1.En general usted diría que su salud es: Excelente (1) Muy buena (2) Buena (3) Regular (4) Mala (5)
2.Las siguientes preguntas se refieren a actividades o cosas que usted podría hacer en un día normal. Su salud actual, ¿le limita para hacer esas actividades o cosas? Si es así, ¿cuánto? a. Esfuerzos moderados, como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de una hora: Sí, me limita mucho (1) Sí, me limita un poco (2) No, no me limita nada (3) b. Subir varios pisos por la escalera: Sí, me limita mucho (1) Sí, me limita un poco (2) No, no me limita nada (3)
3.Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de su salud física? a. ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer? Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

b. ¿Tuvo que dejar de hacer algunas tareas en su trabajo o en sus actividades cotidianas?

Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

4.Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de algún problema de salud emocional (como estar triste, deprimido, o nervioso)?

a. ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer por algún problema emocional?

Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

b. ¿Hizo su trabajo menos cuidadosamente que de costumbre por algún problema emocional?

Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

5.Durante las últimas 4 semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

Nada (1) Un poco (2) Regular (3) Bastante (4) Mucho (5)

6.Las preguntas que siguen se refieren a cómo se ha sentido y cómo le han ido las cosas durante las últimas 4 semanas. En cada pregunta responda lo que más se parezca a cómo se ha sentido usted. Durante las 4 semanas, ¿con qué frecuencia...

a. se sintió calmado y tranquilo?

Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

b. tuvo mucha energía?

Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

c. se sintió desanimado y deprimido?

Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

7.Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

Siempre (1) Casi siempre (2) Algunas veces (3) Sólo alguna vez (4) Nunca (5)

9.4 ARTÍCULOS

1. Pérez-Pereda S, Toriello-Suárez M, Ocejó-Vinyals G, Guiral-Foz S, Castillo-Obeso J, Montes-Gómez S, et al. Serum CGRP, VIP, and PACAP usefulness in migraine: a case-control study in chronic migraine patients in real clinical practice. *Mol Biol Rep.* 2020;47(9):7125-7138.
2. Pérez-Pereda S, Toriello Suárez M, González Quintanilla V, Oterino A. Methylation analysis of NPTX2 and SH2D5 genes in chronic migraine: A case-control study. *Cephalalgia Reports* 2020; 3: 1-6.
3. S. Pérez-Pereda, M Toriello, C. Bailón, O. Umarán Alfageme, F. Hoyuela, V. González-Quintanilla, A. Oterino. Frecuencia e impacto del trastorno por estrés postraumático y los eventos vitales traumáticos en pacientes con migraña. *Neurología*, 2021 (En prensa).

ORIGINAL ARTICLE



Serum CGRP, VIP, and PACAP usefulness in migraine: a case-control study in chronic migraine patients in real clinical practice

Sara Pérez-Pereda¹ · María Toriello-Suárez¹ · Gonzalo Ocejo-Vinyals² · Sandra Guiral-Foz² · Jesús Castillo-Obeso³ · Silvia Montes-Gómez³ · Rosa M. Martínez-Nieto³ · Fernando Iglesias⁴ · Vicente González-Quintanilla¹ · Agustín Oterino⁵

Received: 17 June 2020 / Accepted: 28 August 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Calcitonin gene-related peptide (CGRP), vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38) have relevant roles in migraine pathophysiology. Their serum levels have been proposed as biomarkers for migraine. Our aim was to assess their diagnostic value in real clinical practice in a cohort of chronic migraine (CM), episodic migraine (EM) and healthy controls (HC). We recruited subjects with CM, EM and HC at two medical centers. Blood samples were drawn under fasting conditions in the interictal period, immediately centrifuged and stored at -80°C . Serum levels were determined by ELISA. Neuropeptide levels, the effect of preventatives, correlations with clinical and demographic variables, and their diagnostic value were studied among clinical categories. 296 age- and sex-matched subjects (101 CM, 98 EM and 97 HC) were included. All three neuropeptide serum levels were higher in CM [median and IQ for CGRP = 18.023 pg/ml (14.4–24.7); VIP = 121.732 pg/ml (48.72–186.72) and PACAP = 204.931 pg/ml (101.08–597.64)] vs EM [CGRP = 14.659 pg/ml (10.29–17.45); VIP = 75.603 pg/ml (28.722–107.10); and PACAP = 94.992 pg/ml (65.77–128.48)] and vs HC [CGRP = 13.988 pg/ml (10.095–17.87); VIP = 84.685 pg/ml (35.32–99.79), and PACAP = 103.142 pg/ml (59.42–123.97)]. Using multinomial modeling, only VIP (OR 1.011, 95% CI 1.003–1.018, $p=0.005$) and PACAP (OR 1.003, 95% CI 1.001–1.005, $p=0.002$) increased the risk for CM, but not for EM. CGRP did not predict CM or EM. This model could correctly classify only 62/101 (61.38%) of CM, 75/98 (76.53%) of EM, and 5/97 (4.12%) of HC [globally 147/296 (49.8%)]. Individually, PACAP performed the best for classifying clinical categories [global accuracy 150/296 (50.67%)]. In CM, neuropeptide levels were higher in those OnaBT-treated than in no-treated patients. Although interictal serum CGRP and VIP were higher in CM than both EM or HC, their utility to discriminate migraine categories was low. Contrary to other studies, PACAP serum levels were also higher in CM than in EM or HC and had more discriminative capability to distinguish CM from EM and HC. Further investigation is needed for determination technique standardization.

Keywords CGRP · VIP · PACAP · Migraine · Neuropeptides

✉ Agustín Oterino
agustin.oterino@gmail.com

¹ Neurology Department University Hospital Marqués de Valdecilla and IDIVAL, Cantabria, Spain

² Immunology Department University Hospital Marqués de Valdecilla and IDIVAL, Cantabria, Spain

³ Primary Care Camargo Costa Health Center, Cantabria, Spain

⁴ Neurology Department University Hospital of Burgos, Burgos, Spain

⁵ Neurology Department University Hospital Marqués de Valdecilla and IDIVAL, Avda Valdecilla s/n, 39008 Santander, Cantabria, Spain

Abbreviations

TVS	Trigemino-vascular system
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
VIP	Vasoactive intestinal peptide
PACAP	Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
CM	Chronic migraine
OnaBT	Onabotulinum toxin
TTH	Tension type headache
HC	Healthy controls
EM	Episodic migraine
MOH	Medication overuse headache

Background

Migraine is a complex neurovascular disorder with lacking fully understood pathophysiology. There is enough evidence on the activation of the trigeminal-vascular system (TVS) that leads to the release of vasoactive peptides at their nerve terminals leading to the phenomenon known as neurogenic inflammation, that has been hypothesized to be responsible for migraine throbbing pain [1, 2]. Despite the high frequency of this disorder, affecting 15% of the general population and around 2% in its chronic form [3, 4], diagnosis is based on clinical criteria due to the absence of validated biological markers [5]. Accuracy of migraine diagnosis is troublesome since different types of headaches and comorbidities frequently overlap, especially in chronic headaches [6], something that would be improved with biochemical, radiological and neurophysiological biomarkers.

Searching for useful migraine biomarkers, several authors have investigated plasmatic or serum levels of migraine-involved neuropeptides, such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) [2, 7–19], vasoactive intestinal peptide (VIP) [11, 19–21], and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38) [21–26] (Table 1). CGRP, so far the best known migraine neurotransmitter, is a powerful vasodilator of cranial vessels, released by sensory fibers of the trigeminal nerve, that also exerts neuromodulatory effects on central pain circuits [2]. It is known to be released during migraine attacks [2] and this has been reflected in several studies as an elevation of plasma levels in the external jugular vein and/or peripheral blood in migraine patients, both during and outside attacks [9–13]. It was also seen that these CGRP levels decreased as pain was relieved with triptans [13]. CGRP role in migraine pathophysiology is strongly supported by the fact that its infusion in migraineurs has shown to trigger migraine attacks [27], and that new drugs that antagonize CGRP or its receptors could abort crises [28–30]. It might also have some role in the persistence of pain as has been suggested by the finding of significantly elevated plasma levels in chronic migraine (CM) patients outside attacks [18]. Onabotulinum toxin (OnaBT), a most effective treatment for CM, has proved to reduce plasmatic CGRP levels [16], and higher levels predicted a better response to treatment [17, 19]. All these data have led to proposing its usefulness as a biomarker for CM. However, this hypothesis could not be validated by others [7], addressing the need for further studies. VIP and PACAP-38 are two parasympathetic peptides released by the efferent arm of the trigeminal-facial arch that also have vasoactive functions. VIP serum levels have been found higher during migraine attacks in patients who had parasympathetic

activation [11], and also higher interictally in episodic and CM [19–21]. Peripheral blood VIP levels also help, though to a lesser degree than CGRP, in predicting response to OnaBT [19]. Nevertheless, VIP intravenous infusion to migraineurs, despite causing marked dilation of cranial arteries, does not induce migraine [31]. In view of these results, it seems that VIP could be a marker of parasympathetic nervous system activation, but VIP induced vasodilation is by itself not enough to cause a migraine attack. PACAP-38 has been found higher in plasma from the cubital vein [23], as well as from the external jugular vein [24], during attacks, with plasmatic decrease in responders after sumatriptan administration [24]. Interictal measurements were lower in migraineurs as compared with healthy controls (HC) [23, 24], and tension type headache (TTH) [25], suggesting a difficult to explain PACAP-38 role in migraine pathogenesis. Administered intravenously, it induces migraine-like attacks in 58% of migraineurs [26]. However, unlike CGRP and VIP, interictal PACAP-38 has shown no changes in peripheral blood in CM [21], suggesting a low utility as a CM biomarker. Nevertheless, PACAP-38 plays an important role in migraine, not only in premonitory phase, but also in activation and propagation of trigemino-vascular reflex and neurogenic inflammation, which could exacerbate migraine phenotype [32]. The finding that over 80% of CM patients recognized at least one cranial autonomic parasympathetic symptom [33] could be the manifestation of a more complex phenotype of CM.

Therefore, there are some data pointing to a possible usefulness of these neuropeptides as biological markers of CM, but more validation studies are needed in order to solve some pending unknowns such as optimal detection method, sensitivity, specificity, reproducibility [34], and behavior of these neuropeptides under real conditions. We hypothesized that CGRP, VIP, or PACAP-38 (from now only PACAP) serum levels, or a combination thereof, could serve as biomarkers for migraine, especially for CM. To do this, we determined and compared CGRP, VIP and PACAP interictal serum levels in a case–control study of CM, EM, and HC, and assessed their possible diagnostic value in daily clinical practice, including patients treated or not with oral preventatives and OnaBT.

Methods

We conducted a case–control study approved by the Ethics Committee of Cantabria, Spain. We prospectively recruited migraine patients between 18 and 65 years old in two different medical centers in the Northern Spain (one tertiary center and one primary care center). In consideration of real clinical practice, we gathered patients treated with OnaBT and other preventatives, and also naïve patients to seek the

Table 1 Summary of main human studies measuring plasmatic or serum CGRP, VIP and PACAP in migraine

Study	Sample size (N)	Samples	Technique	Main interest finding (data are presented as mean $\pm$ standard deviation or median and IQ range)
<i>CGRP</i>				
Goadsby et al. Ann Neurol 1990 [11]	22 migraineurs (10 MA vs 12 MWA) vs: 31 HC for the CF group 12 HC for the EJV group.	Peripheral blood (EJV and CF)	RIA	During migraine attacks, there were higher levels in all studied patients in EJV CGRP (92 ± 11 pmol/l in MA; 86 ± 4 pmol/l in MWA) but not in CF (40 ± 11 pmol/l in MA; 43 ± 6 pmol/l in CF)
Tvedskov et al. Ann Neurol 2005 [14]	21 patients (all MWA)	EJV and CF blood	RIA	No differences between EJV or CF CGRP levels during or outside attacks
Sarchielli et al. Cephalalgia 2006 [13]	20 migraine patients [10 responders vs 10 nonresponders to rizatriptan]	EJV	RIA	Higher CGRP levels in responders (12.2 ± 3.2 pmol/l) vs nonresponders (7.4 ± 2.4 pmol/l) After rizatriptan administration CGRP levels decreased corresponding to significant pain relief, whereas there were fewer significant variations in nonresponders
Gallai et al. Cephalalgia 1995 [8]	75 patients (30 MA and 45 MWA) and 30 HC	Antecubital vein	RIA	CGRP levels in MA and MWA were significantly higher during attacks (MA 51.4 ± 7.8 pmol/l; MWA 50.3 ± 6.7 pmol/l) compared with the interictal period In the pain free period there were no differences with the control group (MA 34.7 ± 7.2 pmol/l; MWA 39.3 ± 8.6 pmol/l; HC 38.2 ± 6.5 pmol/l)
Rodríguez-Osorio et al. Neurology 2012 [9]	47 EM and 23 controls	Brachial artery	ELISA	Patients with migraine had higher levels of CGRP (164.2 ± 139.1 pg/ml) vs controls (37.1 ± 38.5 pg/ml), which further increased during migraine attacks (298 ± 100.3 pg/ml)
Fusayasu et al. Pain 2007 [10]	41 MA, 54 MWA and 52 HC	Cubital vein	Enzyme immunoassay (spectrophotometric method)	CGRP interictal plasma levels were higher in MA (18.8 ± 8 pg/ml) and MWA (19.1 ± 9.4 pg/ml) compared to controls (13.4 ± 4.4 pg/ml)
Ashina et al. Pain 2000 [12]	N=40 (6 MA; 14 MWA; 20 controls)	Cubital vein	RIA	Interictal CGRP levels were significantly higher in migraineurs (75 ± 8 pmol/l) vs controls (49 ± 3 pmol/l) Patients suffering exclusively MWA had significantly higher levels (82 ± 10 pmol/l) CGRP levels were higher in female patients (76 ± 9 pmol/l) than in female controls (48 ± 4 pmol/l)

Table 1 (continued)

Study	Sample size (N)	Samples	Technique	Main interest finding (data are presented as mean $\pm$ standard deviation or median and IQ range)
Cernuda-Morollón et al. Neurology 2013 [18]	103 CM women, 43 EM, 31 HC and 14 episodic cluster headache (ECC)	Antecubital vein	ELISA	Interictal CGRP levels were significantly higher in CM (74.90 pg/ml) as compared with HC (33.74 pg/ml) and EM (46.37 pg/ml) and ECC (45.87 pg/ml). Within the CM group, CGRP were significantly higher in those with MA (81.29 ± 27.11 pg/ml) vs MWA (69.65 ± 28.39 pg/ml) ($p = 0.013$). A CGRP concentration of 58.22 pg/ml correctly classified 85.7% of CM.
Cernuda-Morollón et al. Pain 2015 [16]	83 CM, before and one month after OnaBT treatment	Antecubital vein	ELISA	CGRP levels after OnaBT treatment (51.89 pg/ml, range 19.4–10.2) were significantly lower as compared with CGRP levels before treatment (74.09 pg/ml, range 24.0–11.4). One month after treatment, CGRP levels did not change in nonresponders (51.89 pg/ml), but significantly decreased in responders (52.48 pg/ml).
Cernuda-Morollón et al. Headache 2014 [19]	81 CM, 33 HC	Antecubital vein	ELISA	Interictal CGRP was significantly higher in CM (64.9 ± 31.0) vs HC (33.3 ± 15.7). -CGRP were significantly higher in responders to OnaBT (70.4 ± 31.9) than in nonresponders (48.3 ± 21.2). Probability of being a responder to OnaBT was 28 times higher in patients with a CGRP level above the threshold of 72 pg/ml.
Domínguez et al. Headache 2018 [17]	62 CM under OnaBT treatment [47 responders, 15 nonresponders] and 24 HC	Antecubital vein	ELISA	Baseline CGRP levels were significantly higher in responders (133.1 ± 86.6 ng/ml) vs nonresponders (58.2 ± 91.7 ng/ml). CGRP > 50 ng/ml (AUC 0.800; 95% CI 0.652–0.947) was associated with good response.
Lee et al. Head and Pain 2018 [7]	156 migraineurs (106 EM, 50 CM) and 27 HC	Antecubital vein	ELISA	There was no higher interictal levels of CGRP levels in CM (64.9 ± 15.32 pg/ml) compared to EM (67.0 ± 20.70 pg/ml; $p > 0.999$) and HC (75.7 ± 20.07 pg/ml; $p = 0.104$). Higher serum CGRP concentration did not predict treatment response in CM.

Table 1 (continued)

Study	Sample size (N)	Samples	Technique	Main interest finding (data are presented as mean $\pm$ standard deviation or median and IQ range)
<i>VIP</i>				
Goadsby et al. Ann Neurol 1990 [11]	22 migraineurs (10 MA vs 12 MWA) vs 31 HC for the CF group, and 12 HC for the EIV group	EIV and CF	RIA	During migraine attacks, VIP was not higher in migraineurs in EIV or CF than HC. Only two patients in the MA group, with prominent lacrimation and rhinorrhea, had marked elevation in EIV VIP (37 and 36 pmol/l)
Cernuda-Morollón et al. Headache 2014 [19]	81 CM, 33 HC	Antecubital vein	ELISA	CGRP and VIP were significantly higher in CM (173.7 ± 150.7 pg/ml) vs HC (88.5 ± 62.3 pg/ml) Interictal CGRP and to a lesser degree VIP peripheral blood levels, were higher in OnaBT responders (189.7 ± 162.3 pg/ml) vs nonresponders (115.5 ± 76.2 pg/ml)
Cernuda-Morollón et al. Headache 2016 [21]	86 CM, 32 HC, 35 EM	Antecubital vein	ELISA	Interictal VIP levels were significantly higher in CM (136.0 ± 111.5 pg/ml) as compared to HC (88.6 ± 61.0 pg/ml) and EM (103.0 ± 56.7 pg/ml)
<i>PACAP-38</i>				
Tuka et al. Cephalalgia 2013 [23]	87 migraineurs and 40 HC	Cubital vein	RIA	Significant lower PACAP-38 in interictal plasma of migraineurs (24.60 ± 3.59 fmol/ml) as compared with HC (26.54 ± 4.43 fmol/ml) Higher PACAP-38 levels in the ictal period (27.39 ± 4.67 fmol/ml) as compared with the interictal samples (24.91 ± 3.73 fmol/ml)
Zagami et al. Ann Clin Transl Neurol, 2014 [24]	15 (2 MCA and 13 MSA)	External jugular vein	RIA	Reduction in PACAP levels with improvement of migraine headache (from 36 ± 3 pmol/L to 26 ± 3 pmol/L 1 h postsumatriptan)
Han et al. Clin Chim Acta, 2015 [25]	133 migraineurs (95 EM and 38 CM), 106 patients with TTH, 50 HC	Antecubital vein	ELISA	-Interictally lower PACAP (21 ± 3 pmol/L) Significantly lower PACAP-38 levels in migraineurs (32.81 ± 12.78 , range 10.62–77.16 pg/ml) than TTH (39.96 ± 15.90 , range 15.22–74.24 pg/ml) and HC (42.45 ± 13.57 , range 18.00–93.28 pg/ml) Lower levels in EM (34.14 ± 13.12 pg/ml) and CM (29.48 ± 11.39 pg/ml) than in HC ($p=0.001$)

Table 1 (continued)

Study	Sample size (N)	Samples	Technique	Main interest finding (data are presented as mean $\pm$ standard deviation or median and IQ range)
Cernuda-Morollón et al. Headache 2016 [21]	86 CM, 35 EM, 32HC	Antecubital vein	ELISA	No differences in interictal PACAP levels in CM patients (109.8 ± 43.8 pg/ml), EM (98.8 ± 34.3 pg/ml) and HC (108.7 ± 43 pg/ml) ($p=0.884$)

R/A radioimmunoassay, *ELV* external jugular vein, *CF* cubital fossa, *MA* migraine with aura, *MWA* migraine without aura, *HC* healthy controls, *OnaBT* onabotulinum toxin, *TTH* tension type headache

effect of preventatives in serum levels of CGRP, VIP, and PACAP.

Study participants

All participants signed written informed consent before study entry. Subject selection followed a pre-specified scheme 1:1:1, age- and sex-matched for CM, EM, and HC. At the end of the inclusion period, some subjects were excluded for analysis because they did not fit matching criteria. We classified subjects according to the International Classification of Headache Disorders 3 β [35] in CM for at least the last year, EM and HC. HC were recruited among healthy volunteers in the primary care clinic and among family members (8 male patients' spouses), patients' friends, and healthy personnel. HC were asked for any type of acute headache or chronic pain. All subjects were instructed for blood drawing under fasting conditions and having fulfilled headache diary. Among patients, blood samples were drawn from those who had not had a migraine attack in the previous 72 h nor they had consumed acute anti-migraine medication (triptans or NSAID). Exclusion criteria included headache not fitting migraine criteria and insufficient headache information from the previous month. Patients having CM or EM could also have previous medication-overuse headache (MOH) or TTH. Psychiatric comorbidities were not an exclusion criterion. We collected patients' information on demographic variables (age, age at migraine onset, sex and body mass index), clinical variables (migraine with or without aura, total days of headache/term, medication abuse, allodynia), comorbidities (hypertension, hyperlipidemia, smoking, alcoholism, ischemic heart disease, fibromyalgia), contraceptive intake and MIDAS and HIT-6 scales.

Laboratory procedures

All blood samples were drawn at the Headache Clinic of the University Hospital Marqués de Valdecilla, in order to minimize timing for sample handling. A total of 5 ml blood samples was obtained in tubes without anticoagulant and with separating gel, under fasting conditions. Samples were immediately centrifuged, put on ice, aliquoted, and stored at -80°C until analyses, taking a total time of ten minutes. Peripheral blood samples were taken from the antecubital vein from 296 age- and sex-matched subjects (30 males: 12 CM, 9 EM, and 9 HC; and 266 females: 89 CM, 89 EM and 88 HC). Data from seven subjects were discarded because of age-matching failure. ELISA-based assays were performed using commercially available competitive ELISA kits: BlueGene Biotech Co kit (Pudong New District, Shanghai) for PACAP and Cloud-Clone Corp kit (Wuhan, China) for CGRP and VIP, strictly following manufacturers' instructions. Kit detection ranges were 12.35–1000 pg/

ml for CGRP, 6.17–500 pg/ml for VIP and 0–1000 pg/ml for PACAP. All ELISA were performed by the same experienced technician who was blinded for the clinical diagnosis. All samples were analyzed continuously in the same laboratory, under the same environmental conditions, and using the same batch for samples from different clinical groups (CM, EM and HC), in order to avoid a possible batch effect that could condition differences in results in the different groups.

Statistical analysis

Data are reported as the median and interquartile range (IQ), or mean and standard deviation (SD). The *t*-test for independent samples or Kruskal–Wallis (or Mann–Whitney U-test for comparison of two categories) were used depending on the normal distribution for continuous variables by Kolmogorov–Smirnov test. Pearson's "r" statistic was used for bivariate correlation analysis for normal variables, Spearman's "rho" test for non-normal variables, Chi2 for categorical variables. All tests were considered significant for two-tailed $p < 0.05$.

To evaluate the relationship among clinical groups and CGRP, VIP and PACAP, individually, we used a general linear model analysis. A multinomial logistic regression analysis, with clinical groups as polychotomous dependent variable, was performed to evaluate the risk of having CM or EM using serum levels of CGRP, VIP and PACAP as independent variables, adjusted for sex and age. Other confounding variables such as migraine aura, hypertension, diabetes mellitus, alcohol, smoke, hyperlipidemia, or previous ischemic heart disease had been discarded for logistic regression as they had no effect on neuropeptide levels (data not shown). A p value < 0.05 was considered to indicate statistical significance. Odds ratios (ORs) are expressed with their 95% confidence interval (CI). Additionally, we evaluated the power of CGRP, PACAP, and VIP to correctly classify clinical groups, obtaining proportions for the global sample and for specific clinical group. We have taken into consideration the potential collinearity of independent variables analyzing the variation inflation factor and tolerance. In a second model, we used only migraine categories, serving EM as reference.

All tests were performed with the SPSS package (IBM SPSS Statistics for Windows, v22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Sample size calculations

For this purpose, we used published data for CGRP, PACAP, and VIP means and SD [18, 20, 21]. We calculated sample size necessary to discriminate CM and non-CM groups in the worst scenario. Thus, we obtained a power of 90% for CGRP ($n = 90$; $\alpha = 0.01$) and PACAP ($n = 81$;

$\alpha = 0.01$) for mean differences of 20%; and a power of 80% ($n = 87$; $\alpha = 0.05$) for VIP mean differences of 30%.

Results

Clinical results

This is the primary analysis of present data. A total of 296 subjects, 30 male and 266 female, were recruited from March 2016 to May 2019; 101 had CM (mean age 41 ± 10 y), 98 had EM (mean age 41 ± 10 years) and 97 were HC (mean age 41 ± 10 years). A total of 48 patients had migraine with aura (MA) (26 CM and 22 EM); a total of 8 CM patients and 5 EM had exclusively MA. Clinical and demographic characteristics are summarized in Table 2. A total of 81 patients (69 CM, 12 EM) were on preventive treatments; of these, 42 CM were on OnaBT, and 39 on other preventatives (27 CM).

Univariate analyses

For all neuropeptides, we had no missing data. We found that CGRP, VIP and PACAP were significantly higher in CM [median and IQ = 18.023 pg/ml (14.4–24.7), 121.732 pg/ml (48.72–186.72) and 204.931 pg/ml (101.08–597.64), respectively] vs EM [CGRP = 14.659 pg/ml (10.29–17.45); VIP = 75.603 pg/ml (28.722–107.10); and PACAP = 94.992 pg/ml (65.77–128.48)] and vs HC [CGRP = 13.988 pg/ml (10.095–17.87); VIP = 84.685 pg/ml (35.32–99.79), and PACAP = 103.142 pg/ml (59.42–123.97)] ($p < 0.001$ for all comparisons). There were no differences between EM and HC for all these neuropeptides. We observed that ranges were wider in CM than EM and HC, especially for PACAP (Fig. 1).

Migraine aura, hypertension, diabetes mellitus, alcohol, smoke, hyperlipidemia, or previous ischemic heart disease had no effect on neuropeptide levels (data not shown).

Bivariate analyses

We observed weak correlation of all these neuropeptides with some headache outcomes, such as MIDAS ($\rho = 0.337$, $p < 0.001$ for PACAP; $\rho = 0.214$, $p = 0.009$ for VIP; and $\rho = 0.250$, $p = 0.002$ for CGRP), but only PACAP had some correlation with total headache days ($\rho = 0.266$, $p = 0.002$). Age had a marginal effect on CGRP levels ($\rho = -0.152$, $p = 0.011$) and none on VIP ($\rho = -0.027$, $p = 0.654$) or PACAP levels ($\rho = 0.094$, $p = 0.115$). We observed that sex could have some effect on CGRP [for male, OR 1.097 (1.01–1.19; $p = 0.025$) and VIP [for male, OR = 0.993 (0.98–1.0; $p = 0.037$)] serum levels. CGRP had a moderate correlation with VIP ($r = 0.558$, $p < 0.001$), and

PACAP ($r=0.504$, $p<0.001$), VIP and PACAP also correlated, but in an even lesser degree ($r=0.435$, $p<0.001$).

Effect of preventatives on CGRP, PACAP, and VIP serum levels.

We have also investigated the relationship of CGRP, PACAP, and VIP with preventatives in CM and EM patients. In CM patients, median and IQ differed from those under OnaBT treatment ($n=42$) and other preventatives ($n=27$) or no treatment ($n=32$, Table 3). Univariate analysis disclosed that all three neuropeptides had higher levels in OnaBT treated patients having CM [OR = 1.088 (1.03–1.16) for CGRP, $p=0.006$; OR = 1.003 (1.001–1.005), for PACAP, $p=0.002$; OR = 1.018 (1.009–1.03), $p<0.001$] than no treated patients. However, age had some effect on the risk of CM and having OnaBT treatment [OR = 1.067 (1.02–1.12), $p=0.010$], but sex did not (Table 4). Modeling preventative treatment as dependent variable, age, sex and neuropeptides as independent variables, we observed that the relationship of CGRP and PACAP is lost comparing OnaBT treatment with no treatment, adjusted for sex and age, but also that VIP and age increased the risk for being under OnaBT treatment;

but PACAP still increased the risk for having other treatments against no treatment [OR = 1.002 (1.000–1.004), uncorrected $p=0.044$]. In this model, the risk for being on OnaBT treatment versus other treatments in CM patients is only age-dependent (Table 4).

For EM patients, only PACAP distribution varied between subjects with other preventatives [$n=86$; median and IQ = 98.991 pg/ml (69.16–168.23)] and those with no treatment [$n=12$; 91.919 pg/ml (64.99–126.74); $p=0.019$, using Mann–Whitney U test].

Multinomial logistic regression modeling

We also evaluated the association of CGRP, PACAP and VIP and clinical categories, using a model adjusted for age and sex. This model could explain a third of the total variance [Pearson's goodness-of-fit $\chi^2=554.617$ ($p=0.344$), and Nagelkerke's pseudo $R^2=0.313$]. Only VIP [OR = 1.011 (95% CI 1.004–1.018, $p=0.005$)] and PACAP [OR = 1.003 (95% CI 1.001–1.005), $p=0.002$] increased the risk for CM, but not for EM (Table 5). CGRP did not influence CM or EM clinical diagnosis. This model could correctly classify only 62/101 patients (61.38%) of CM, 75/98 (76.53%) of EM, and

Table 2 Demographics and clinical characteristics

	Chronic migraine $n=101$	Episodic migraine $n=98$	Healthy controls $n=97$	p value
Female n (%)	89/101 (89.9)	89/98 (90.8)	88/97 (90.8)	0.773
Age y^a	41 ± 10	41 ± 10	41 ± 10	0.998
Age at onset y^a	15 ± 9	19 ± 10	N/A	0.038
HIT-6 ^a	61.864 ± 13.0	58.441 ± 8.9	N/A	0.105
MIDAS ^a	68.795 ± 65.79	17.173 ± 26.5	N/A	<0.001
Days with headache/term ^{a b}	48 ± 2	17 ± 22	N/A	<0.001
MA ^c n (%)	26/101 (26%)	22/98 (22%)	N/A	0.743
Only MA n	8/101 (8%)	5/98 (5%)		
Refractory migraine n (%)	18/101 (17.8%)	1/98 (1.02%)	N/A	<0.001
Co-existing tension-type headache n (%)	34/101 (33.7%)	22/98 (22.4%)	0/97 (0%)	0.079 ^d
Previous MOH n (%)	20/101 (19.8%)	3/98 (3.06%)	N/A	<0.001
Hypertension n (%)	8/101 (7.9%)	4/98 (4.08%)	2/97 (2.06%)	0.315
Hyperlipidemia n (%)	10/101 (9.9%)	12/98 (12.2%)	14/97 (14.4%)	0.621
Ischemic heart disease n (%)	0/101 (0%)	1/98 (1%)	0/97 (0%)	0.99
Smoker n (%)	25/101 (24.7%)	23/98 (24.5%)	26/97 (26.8)	0.845
Alcohol n (%)	27/101 (26.7%)	19/98 (19.4%)	15/97 (15.5%)	0.145
Contraceptives n (%)	8/101 (7.9%)	24/98 (24.5%)	20/97 (20.6%)	0.001
BMI (n) ^a	25.497 ± 5.1 (83)	25.164 ± 4.3 (65)	25.300 ± 4.8 (73)	0.768
Fibromyalgia n (%)	5/101 (4.9%)	3/98 (3.06%)	0/97 (0%)	<0.001
Alodynia n (%)	51/101 (50.5%)	18/98 (18.4%)	N/A	<0.001

^aMean $\pm$ SD

^bTerm = 90 days

^cRefers to predominantly migraine with aura

^dIt refers to comparison between CM and EM

HIT headache impact test, MIDAS Migraine Impact Disability Scale, BMI body mass index

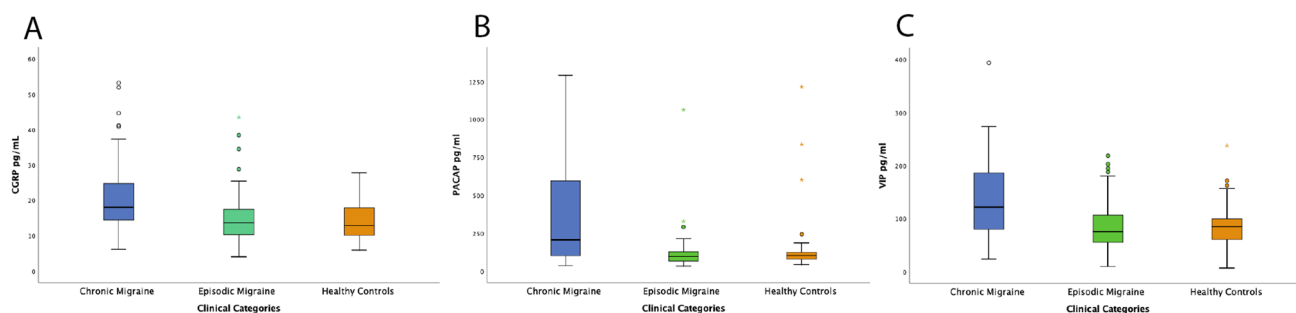


Fig. 1 Box-plots showing median and interquartile range (IQ) of interictal serum CGRP (a), VIP (b) and PACAP (c) in each clinical group (CM, EM and HC)

5/97 (4.12%) of HC [globally 147/296 subjects (49.8% was correctly classified)].

Individually, CGRP correctly classified 133/296 patients (44.93%) [60/101 (59.4% of CM); 60/98, (61.22% of EM), and 8/97 (8.3% of HC)], PACAP 150/296 (50.67%) [53/101 (52.47% of CM), 91 (92.85% of EM), and 0/97 (0.0% of HC)], and VIP 137/296 (46.28%) [62/101 (61.38% of CM; 69/98 (70.4%) of EM, and 0/97 (0.0% of HC)].

Although all three neuropeptides showed moderate correlation in the covariance matrix among them (CGRP-PACAP, $r=0.504$, $p<0.001$; CGRP-VIP, $r=0.558$, $p<0.001$; and PACAP-VIP, $r=0.435$, $p<0.001$), the degree of collinearity was low (variance inflation factor=1.145 for CGRP-VIP and CGRP-PACAP, and 1.226 for PACAP-VIP) and tolerance was higher than 0.8 for all correlations.

Discussion

To our knowledge, this is the first time that a joint assessment of CGRP, VIP and PACAP serum levels and correlations among them have been studied in patients with CM and EM. There is a long debate about whether serum levels in peripheral blood of these neuropeptides reflect the activation of the TVS and whether they can help us to differentiate migraine clinical categories (CM vs EM) [7, 18, 20, 21, 34, 36]. This latter question has been the rationale for our study.

Neuropeptide levels in chronic migraine

Firstly, we found that interictal serum CGRP, VIP and PACAP were significantly higher in CM compared to EM and HC (Fig. 1). Regarding CGRP, these findings concur with some previously reported [18], but disagree with others [7]. Some authors have found higher CGRP levels in MA than in migraine without aura [12, 18], so a lower prevalence of MA within the CM group has been suggested to condition no differences between CM and EM [7]. However, we found no effect of MA on CGRP serum levels. Actually, mean CGRP values for the different clinical categories varied throughout published studies. Our observed median values of CGRP ranged from 14 pg/mL in HC to 20.4 pg/mL in CM; those observed in Lee et al. [7] from 75.7 pg/mL in HC to 64.9 pg/mL in CM; and those in Cernuda-Morollón et al. [18] from 33.74 pg/mL in HC to 74.9 pg/mL in CM. Given that the procedure and ELISA-based assay kits used were the same, it is possible that differences in ELISA performance, instability of the detecting antibody, or other, unreliable conditions could render disparate results across laboratories.

Regarding VIP, according to our results, other researchers also found higher interictal serum levels in CM [20]. Nevertheless, the present study is the first to show elevated interictal serum PACAP levels in CM [21].

In the univariate analyses, we also observed that ranges of the concentrations of neuropeptides in the CM group were strikingly wider than in EM and HC groups, especially for PACAP (Fig. 1). These data suggest that there is a large

Table 3 Neuropeptide serum levels according to active preventive treatment in chronic migraine patients

	OnaBT treatment	Other preventatives	No Preventatives	<i>p</i> value*
CGRP pg/mL	20.726 (16.56–30.11)	17.596 (14.9–21.9)	13.479 (9.6–19.72)	<0.001
PACAP pg/mL	414.502 (217.90–622.50)	134.797 (91.4–753.4)	114.143 (79.90–156.4)	0.001
VIP pg/mL	167.070 (120.45–210.30)	94.496 (74.9–151.6)	80.872 (52.7–128.1)	<0.001

Values are given as median and interquartile range

*Kruskal–Wallis test

Point estimates are given as median (inter-quartile range)

Table 4 Results of univariate analysis and multinomial logistic regression modeling for preventive treatment groups and neuropeptide serum levels

Univariate analysis				
	OnaBT treatment OR (95%C.I.)	<i>p</i> value	Other preventatives OR (95%C.I.)	<i>p</i> value
CGRP	1.088 (1.03–1.16)	0.006	1.048 (0.98–1.12)	0.155
PACAP	1.003 (1.001–1.005)	0.002	1.003 (1.001–1.005)	0.011
VIP	1.018 (1.009–1.03)	<0.001	1.006 (0.99–1.02)	0.203
AGE	1.067 (1.02–1.12)	0.010	0.983 (0.94–1.03)	0.486
SEX	1.167 (0.3–4.5)	0.824	0.560 (0.1–3.3)	0.523
Model 1 ^a				
	OnaBT treatment OR (95%C.I.)	<i>p</i> value	Other preventatives OR (95%C.I.)	<i>p</i> value
CGRP	1.021 (0.94–1.11)	0.609	0.992 (0.91–1.08)	0.853
PACAP	1.002 (1.000–1.004)	0.124	1.002 (1.000–1.004)	0.044
VIP	1.013 (1.003–1.02)	0.011	1.003 (99–1.014)	0.589
AGE	1.066 (1.01–1.13)	0.022	0.978 (0.93–1.03)	0.385
SEX	1.459 (0.25–8.5)	0.676	0.541 (0.08–3.8))	0.537
Model 2 ^b				
	OnaBT treatment OR (95%C.I.)	<i>p</i> value		
CGRP	1.064 (0.96–1.17)	0.227		
PACAP	0.999 (0.99–1.001)	0.324		
VIP	1.008 (0.99–1.02)	0.119		
AGE	1.086 (1.03–1.15)	0.005		
SEX	2.875 (0.3–25.1)	0.340		

^aThis model was constructed using preventive treatment categories as dependent variable -no active preventive treatment as reference, sex as factor -using female as reference-, and age, CGRP, PACAP, and VIP as independent variables

^bSame as Model 1, but dependent variable had two categories, OnaBT treated patients, and, as reference, no preventatives

OnaBT Onabotulinum toxin

Significant *p* values are highlighted in bold

interindividual variation to the detriment of accurate clinical diagnosis. Such a variation of these neuropeptide serum levels does not conform to the hypothesis of a persistent TVS activation in CM, as previously suggested [18], against the explanation that frequent migraine attacks increase the probability for detecting higher neuropeptide levels. But again, there is variability among studies. The ranges of CGRP, VIP and PACAP concentrations are also wider in CM in Cernuda-Morollón et al. studies [18, 21], while Lee et al. [7] found greater variation in CGRP levels in the EM group.

Neuropeptide levels in episodic migraine

In the present study, serum CGRP, VIP and PACAP were not significantly higher in EM than in HC. These results support an episodic and less frequent activation of the TVS in these patients. Regarding CGRP, this concurs with Lee et al. findings [7], but disagree with two other studies that

determined CGRP also in peripheral blood outside episodes in EM patients [10, 12]. These studies recruited subjects solely from specialized clinics, which could condition a selection bias of patients with more frequent migraines than those recruited in our study, both from a specialized clinic and primary care. However, stratified analysis according to headache frequency, performed by Lee et al. [7], as well as by Ashina et al. [12], did not find any such correlation. In the present study, only PACAP showed some correlation to total headache days.

Our results reflecting no higher PACAP levels in EM than HC, concur with the preceding ones [21, 23, 24], unlike those of VIP, whose levels have been reported higher in EM compared to HC [20]. It should be noted that VIP may preferentially rise in those patients who experience marked autonomic symptoms [37], and the proportion of patients with autonomic symptoms was not assessed in this study.

Table 5 Results of univariate analysis and multinomial logistic regression modeling for clinical categories and neuropeptides levels

Univariate analysis				
	Chonic migraine OR (95% C.I.)	<i>p</i> value	Episodic migraine OR (95% C.I.)	<i>p</i> value
CGRP	1.125 (1.07–1.18)	< 0.001	1.020 (0.97–1.07)	0.439
PACAP	1.005 (1.003–1.007)	< 0.001	0.998 (0.99–1.001)	0.207
VIP	1.018 (1.01–1.02)	< 0.001	1.001 (0.99–1.008)	0.734
AGE	1.001 (0.98–1.03)	0.965	1.001 (0.98–1.03)	0.961
SEX	1.318 (0.529–3.28)	0.553	0.989 (0.38–2.61)	0.982
Model 1 ^a				
	Chonic migraine OR (95% C.I.)	<i>p</i> value	Episodic migraine OR (95% C.I.)	<i>p</i> value
CGRP	1.052 (0.992–1.115)	0.092	1.027 (0.97–1.09)	0.376
PACAP	1.003 (1.001–1.005)	0.002	0.998 (0.995–1.001)	0.180
VIP	1.011 (1.003–1.018)	0.005	1.001 (0.993–1.008)	0.818
AGE	1 (0.968–1.032)	0.992	0.998 (0.97–1.027)	0.914
SEX	1.904 (0.595–6.091)	0.278	1242 (0.409–3.767)	0.702
Model 2 ^b				
	Chonic migraine OR (95% C.I.)	<i>p</i> value		
CGRP	1.025 (0.97–1.08)	0.375		
PACAP	1.005 (1.002–1.008)	< 0.001		
VIP	1.007(1.0–1.014)	0.041		
AGE	0.997 (0.97–1.03)	0.856		
SEX	1.466 (0.475–4.5)	0.506		

CGRP calcitonin gene-related peptide, PACAP pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38, VIP vasoactive intestinal peptide

^aThis model was constructed using clinical categories as dependent variable, sex as factor -using female as reference-, and age, CGRP, PACAP, and VIP as independent variables

^bSame as Model 1, but dependent variable had two categories, chronic migraine, and, as reference, episodic migraine

Significant results are highlighted in bold

Correlations

We found moderate correlations between VIP and PACAP, VIP and CGRP, and PACAP and CGRP. The activation of the TVS is believed to result in the release of CGRP by the trigeminal nerve terminals, and VIP and PACAP by the efferent arm of the trigeminal-facial arch. Although in some individuals the release of one peptide may predominate over another, there seems to be a certain correlation among their levels, indicating that all of them may participate somewhat in most migraine pain.

The inverse correlation obtained between age and CGRP, though marginal, could correspond to changes in headache severity in migraine attacks that occur with aging, with decreasing throbbing, pressure and stabbing [38], which might mean less TVS activation during attacks and lower neuropeptide release. This differs from the studies by Cernuda-Morollón et al. and Lee et al. in which CGRP concentrations were not influenced by age [7, 18]. From our explanation, we would have expected to find an inverse correlation with PACAP and VIP as well, which, like others [21], we did

not. In the case of VIP, its levels may depend on the presence and intensity of autonomic symptoms [37]. A further study is warranted to analyze the correlation between VIP and the presence of autonomic symptoms.

Neuropeptide levels and preventive treatment relationship

We have observed that CGRP, VIP, PACAP and age were all higher in CM patients under OnaBT treatment than those with no preventatives in univariate analysis, but only age and VIP increased the risk of being in the OnaBT treatment group after adjustments. CGRP levels decreased from 76.85 pg/mL to 52.48 pg/mL in CM patients considered responders in one study [16]. It is noteworthy that even after OnaBT treatment, CGRP still remained higher than that observed in controls in a previous study of the same group [18]. There are no previous reports analyzing PACAP or VIP as treatment response. Our study was not specifically designed for studying treatment effect in CGRP, PACAP, or

VIP serum levels; then our findings with PACAP and VIP must be taken cautiously.

Diagnostic value

No other study has performed a multinomial regression modeling including these 3 neuropeptides to assess their overall effect on migraine, which was globally as low as 49.8%. Individually, CGRP was the worst at classifying clinical groups, being 44.93% of subjects correctly classified, and only 59.4% of CM patients. Using ROC curves, Cernuda-Morollón et al. found that a CGRP concentration of 58.22 pg/ml correctly classified 85.7% of CM [18]. Although in the latter study, diagnostic value of CGRP would be higher, both show a non-negligible percentage of CM patients (40% and 15%) that would not be correctly classified by CGRP. It has been hypothesized that CM patients whose CGRP levels are in the range of HC may suffer from other headaches mimicking CM, or that the pain in these cases is secondary to the release of other substances [36]. Our opinion is that these values depend on the moment in which they are determined and on the procedure of determination. Surprisingly, in the present study PACAP levels correctly classified more than 92% of EM, a diagnostic value that had not been previously reported. None of the neuropeptides was useful to discriminate HC from migraine patients.

This study has several limitations. Although we fitted with preliminary sample size calculations, present sample size maybe needs to be increased to get enough power for multiple comparisons and stratified analyses. Regarding sampling, there were 81 patients under preventative treatments who were not withdrawn as they formed part of our secondary objectives. This could have influenced neuropeptide levels in the EM and CM groups. Though this effect has not been demonstrated for oral preventatives [18], CGRP has shown to decrease in good responders to OnaBT treatment [16]. However, in this study, as we already mentioned, serum levels of OnaBT-treated patients continued to be higher than those untreated patients in the CM group. Regarding laboratory procedures, sample handling and peptide determination are unsolved issues that need further studies to ensure uniformity analyzing these neuropeptides. In the present study, samples were taken and stored at -80°C in less than 10 min as recommended. Although degradation time after centrifugation is not known [7], we have made, as previous researchers, great efforts to minimize the time until analysis. Finally, some of the kits used are not specific for the peptide under analysis. For instance, PACAP kit, measures both PACAP-27 and PACAP-38, but PACAP-38 is the most prevalent isoform in mammals [22], and this kit is the same that previous researchers used [21].

The present study also has some strengths, such as a bigger sample size than most similar previous studies, age- and

sex-matched samples in order to minimize possible age and sex variations [39] and the joint analyses of three neuropeptides, something which allowed us to study correlations to help better understand the process of TVS activation. A subset of subjects was recruited in a primary care center, thereby avoiding any possible selection bias of only the most severely impaired patients recruited in specialized clinics. Additionally, unlike some previous studies [18], we did not exclude patients with psychiatric comorbidities, something which makes our sample more representative of the reality in a Headache Clinic.

Conclusions

We found that interictal serum CGRP, VIP, and, for the first time PACAP levels, were significantly higher in CM than both EM and HC, regardless of preventative treatments. These findings support the role of the three neuropeptides in migraine, but more specifically in CM. However, with currently available techniques, CGRP, VIP and PACAP serum levels are hardly useful individually or jointly to discriminate migraine clinical categories. Only PACAP showed a significant capacity to correctly classify the EM. Although there is a prevailing need for a migraine biomarker feasible worldwide using standardized techniques, nowadays, being CGRP the best candidate as a migraine biomarker [36], there is no consistent method for its analysis. Sample handling and determination process of these neuropeptides needs to be standardized. Our results regarding the PACAP role in CM need further replication.

Acknowledgements We are indebted to John Hopkins for style revision.

Author contributions SPP, MTS and AOD conceived and designed the study. SPP, MTS, JCO, SMG, RMMN, FI, VGQ and AOD collected data. MTS, GOV and SGF designed the experimental procedures and performed the ELISA. SPP, MTS and AOD analyzed data and drafted the manuscript. SPP, MTS, VGQ and AOD critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This work has received funding from the Carlos III Health Institute, Madrid, Spain (Grant ISCIII-FISS PI15/01285) and private funds of Marqués de Valdecilla Research Institute (IDIVAL), Santander, Spain.

Data availability All relevant data are within the article. Raw data can be obtained by contacting the corresponding author (agustin.oterino@gmail.com).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval The Ethics Committee of Cantabria of Cantabria, Spain, approved this study (2015.155) and each patient provided written informed consent.

References

- Geppetti P, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR (2005) CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. *J Headache Pain* 6:61–70
- Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ (2010) CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat Rev Neurol* 6:573–582
- Matías-Guio J, Porta-Etessam J, Mateos V, Díaz-Insa S, Lopez-Gil A, Fernández C et al (2011) One-year prevalence of migraine in Spain: a nationwide population-based survey. *Cephalalgia* marzo de 31:463–470
- Natoli JL, Manack A, Dean B, Butler Q, Turkel CC, Stovner L et al (2010) Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia* 30:599–609
- Durham P, Papapetropoulos S (2013) Biomarkers associated with migraine and their potential role in migraine management. *Headache* 53:1262–1277
- Buse DC, Manack A, Serrano D, Turkel C, Lipton RB (2010) Sociodemographic and comorbidity profiles of chronic migraine and episodic migraine sufferers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:428–432
- Lee MJ, Lee S-Y, Cho S, Kang E-S, Chung C-S (2018) Feasibility of serum CGRP measurement as a biomarker of chronic migraine: a critical reappraisal. *J Headache Pain* 19:53
- Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G et al (1995) Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia* 15:384–390
- Rodríguez-Osorio X, Sobrino T, Brea D, Martínez F, Castillo J, Leira R (2012) Endothelial progenitor cells: a new key for endothelial dysfunction in migraine. *Neurology* 79:474–479
- Fusayasu E, Kowa H, Takeshima T, Nakaso K, Nakashima K (2007) Increased plasma substance P and CGRP levels, and high ACE activity in migraineurs during headache-free periods. *Pain* 128:209–214
- Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R (1990) Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 28:183–187
- Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Olesen J (2000) Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain* 86:133–138
- Sarchielli P, Pini LA, Zanchin G, Alberti A, Maggioni F, Rossi C et al (2006) Clinical-biochemical correlates of migraine attacks in rizatriptan responders and non-responders. *Cephalalgia* 26:257–265
- Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, Iversen HK, Schifter S, Olesen J (2005) No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol* 58:561–568
- Edvinsson L, Ekman R, Goadsby PJ (2010) Measurement of vasoactive neuropeptides in biological materials: problems and pitfalls from 30 years of experience and novel future approaches. *Cephalalgia* 30:761–766
- Cernuda-Morollón E, Ramón C, Martínez-Camblor P, Serrano-Pertierra E, Larrosa D, Pascual J (2015) OnabotulinumtoxinA decreases interictal CGRP plasma levels in patients with chronic migraine. *Pain* 156:820–824
- Domínguez C, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, Sobrino T, Rodríguez-Osorio X, López A et al (2018) CGRP and PTX3 as predictors of efficacy of onabotulinumtoxin type A in chronic migraine: an observational study. *Headache* 58:78–87
- Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Camblor P, Pascual J (2013) Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology* 81:1191–1196
- Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Ramón C, Larrosa D, Serrano-Pertierra E, Pascual J (2014) CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache* 54:987–995
- Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Alvarez R, Larrosa D, Ramón C, Pascual J (2015) Increased VIP levels in peripheral blood outside migraine attacks as a potential biomarker of cranial parasympathetic activation in chronic migraine. *Cephalalgia* 35:310–316
- Cernuda-Morollón E, Riesco N, Martínez-Camblor P, Serrano-Pertierra E, García-Cabo C, Pascual J (2016) No change in interictal PACAP levels in peripheral blood in women with chronic migraine. *Headache* 56:1448–1454
- Rubio-Beltrán E, Correnti E, Deen M, Kamm K, Kelderman T, Papetti L et al (2018) PACAP38 and PAC1 receptor blockade: a new target for headache? *J Headache Pain* 19:64
- Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J, Szabó N et al (2013) Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia* 33:1085–1095
- Zagami AS, Edvinsson L, Goadsby PJ (2014) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and migraine. *Ann Clin Transl Neurol* 1:1036–1040
- Han X, Dong Z, Hou L, Wan D, Chen M, Tang W et al (2015) Interictal plasma pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide levels are decreased in migraineurs but remain unchanged in patients with tension-type headache. *Clin Chim Acta* 450:151–154
- Schytz HW, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J, Ashina M (2009) PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain* 132:16–25
- Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J (2002) CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 22:54–61
- Edvinsson L, Linde M (2010) New drugs in migraine treatment and prophylaxis: telcagepant and topiramate. *Lancet* 376:645–655
- Marcus R, Goadsby PJ, Dodick D, Stock D, Manos G, Fischer TZ (2014) BMS-927711 for the acute treatment of migraine: a double-blind, randomized, placebo controlled, dose-ranging trial. *Cephalalgia* 34:114–125
- Voss T, Lipton RB, Dodick DW, Dupre N, Ge JY, Bachman R et al (2016) A phase IIb randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ubrogepant for the acute treatment of migraine. *Cephalalgia* 36:887–898
- Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, Fahrenkrug J, Olesen J, Ashina M (2008) Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine. *Cephalalgia* 28:226–236
- Waschek JA, Baca SM, Akerman S (2018) PACAP and migraine headache: immunomodulation of neural circuits in autonomic ganglia and brain parenchyma. *J Headache Pain* 19:23
- Riesco N, Pérez-Alvarez AI, Verano L, García-Cabo C, Martínez-Ramos J, Sánchez-Lozano P et al (2016) Prevalence of cranial autonomic parasympathetic symptoms in chronic migraine: Usefulness of a new scale. *Cephalalgia* 36:346–350
- Riesco N, Cernuda-Morollón E, Pascual J (2017) Neuropeptides as a Marker for Chronic Headache. *Curr Pain Headache Rep* 21:18
- Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) (2013) The international classification of headache disorders. *Cephalalgia* 33:629–808

36. Ramón C, Cernuda-Morollón E, Pascual J (2017) Calcitonin gene-related peptide in peripheral blood as a biomarker for migraine. *Curr Opin Neurol* 30:281–286
37. Riesco N, Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Pérez-Alvarez AI, Verano L, García-Cabo C et al (2017) Relationship between serum levels of VIP, but not of CGRP, and cranial autonomic parasympathetic symptoms: a study in chronic migraine patients. *Cephalalgia* 37:823–827
38. Kelman L (2006) Migraine changes with age: IMPACT on migraine classification. *Headache* 46:1161–1171
39. Valdemarsson S, Edvinsson L, Hedner P, Ekman R (1990) Hormonal influence on calcitonin gene-related peptide in man: effects of sex difference and contraceptive pills. *Scand J Clin Lab Invest* 50:385–388

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Methylation analysis of NPTX2 and SH2D5 genes in chronic migraine: A case–control study

Sara Pérez Pereda, María Toriello Suárez,
Vicente González Quintanilla, and Agustín Oterino

Abstract

Background: Methylation of two CpG sites related to neuronal pentraxin II protein (NPTX2) and SH2 domain containing 5 protein (SH2D5), corresponding to two neuroplasticity genes, has been associated to headache chronification. We aimed to investigate the epigenetic modification of these two genes in chronic migraine (CM).

Methods: We conducted a case–control study in which the DNA of 305 age- and sex-matched subjects classified according to the International Classification of Headache Disorders version beta (ICHD-III β) in CM (109), episodic migraine (EM; $n = 98$), and healthy controls (HC; 98) was analyzed. Real-time quantitative methylation-specific PCR was performed using specific methylation primers for two representative CpG sites within these genes.

Results: We found no significant differences in methylation level between CM, EM, and HC in the first exon of the NPTX2 gene nor in the 5' upstream region of the SH2D5 gene. Methylation level in the first exon of the NPTX2 showed a low correlation with age ($r = 0.266$; $p < 0.005$).

Conclusion: We did not find methylation level differences in analyzed regions related to NPTX2 and SH2D5 in our CM sample. Despite the potential relevance of neuroplasticity genes in headache chronification, we conclude that CM is a more heterogeneous clinical diagnosis than desired and that an epigenetic marker remains elusive.

Keywords

chronic migraine, DNA methylation, epigenetics, headache chronification, neuroplasticity

Date received: 18 September 2019; accepted: 10 April 2020

Introduction

Migraine is a common and disabling neurological disease with a global prevalence of approximately 15%,^{1–3} the pathophysiology of which is not completely clear. The mechanisms by which migraine becomes chronic, as occurs in around 2% of the general population,⁴ are even less known.

There is evidence of an important genetic component in migraine⁵ with tens of genetic variants associated with common forms of the disease.⁶ Most replicated variants confirmed several loci at PR Domain-Containing 16 (PRMD16),^{7–10} Myocyte Enhancer Factor 2D (MEF2D),^{9,11} Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M

Member 8 (TRMP8),^{7,9,11} Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 (TGFB2),^{9,11} Phosphatase And Actin Regulator 1 (PHACTR1),^{9,11} Metadherin (MTDH),^{8,9,11} Astrotactin 2 (ASTN2),^{9,11} and LDL Receptor Related Protein 1 (LRP1),^{7,9} but effect sizes were discrete (odds ratio lower

Department of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla and IDIVAL, Santander, Spain

Corresponding author:

Agustín Oterino, Department of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Avda Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain.

Email: agustin.oterino@gmail.com



than 2 in all cases). In particular, susceptibility genes for chronic migraine (CM) remain unknown.

Environmental factors could play an important role in migraine, not only as triggers of an acute attack but inducing chronic changes in the brain that make it more susceptible to migraine.¹² Epigenetic mechanisms have the potential to link environmental influences with changes in gene expression that might lead to disease phenotype.¹³ Thus, epigenetics is an emerging field in the study of some complex disorders such as migraine. Through epigenetic mechanisms, some environmental factors such as stress, female sexual hormones, and neuronal activity could cause changes in gene expression in brain pathways involved in migraine.¹² Interestingly, a high frequency of attacks, due to high neuronal activity, has been shown to produce changes in brain epigenome in genes implicated in neuronal plasticity¹⁴ reducing the threshold for suffering new bouts,¹² which suggests the potential relevance of epigenetics in migraine chronification.

Despite this body of evidence, epigenetic studies in migraine are still scarce.^{15,16} The first epigenome-wide association study (EWAS) performed in chronic headache (CH), published by Winsvold et al. in 2017,¹⁷ found that the two 5'-cytosine-p-guanine-3' (CpG) sites differentially methylated with strongest association to headache chronification were related to two brain-expressed genes involved in the regulation of synaptic plasticity: SH2 domain containing 5 protein (SH2D5) and neuronal pentraxin II protein (NPTX2), supporting a role of neuroplasticity pathways in the chronification process.

Our aim was to investigate if these two genes were epigenetically modified in a CM sample, strictly defined by the 3rd edition of the International Classification of Headache Disorders version beta (ICHD-III β) criteria,¹⁸ as a headache suffered by the patient for 15 or more days a month, for (at least) the last 3 months, and in which at least 8 of these days have to meet strict criteria for migraine, and in the other 7 days any of the criteria.

Methods

Design

We designed a case-control study conducted in the Headache Clinic of the University Hospital Marqués de Valdecilla in the Northern Spain. The study was approved by the Ethics Committee of Cantabria.

Participants

A total sample of 545 migraine patients and 390 healthy controls (HC) were identified from 2015 to date in our Headache Unit database belonging to three outpatient clinics. From this pool of subjects, a selection process followed a prespecified scheme of 1-1-1, age- and sex-matched for CM, episodic migraine (EM), and HC. A total

of 305 subjects, aged 18–65 years, were finally gathered in the study after signing informed consent. Although sample was slightly unbalanced, with an excess of migraine patients, age and sex matching was always accomplished. All migraineurs were classified according to the ICHD-III β in CM and EM. CM patients fulfilled criteria even when they were on Onabotulinum toxin treatment, or under other preventatives; EM patients had never been diagnosed as CM, and HC had never had primary headaches. HC were selected among healthy family members (only eight males' spouses) or friends, and staff volunteers.

For all participants, clinical and demographic variables and comorbidities were collected, including sex, age, age of onset of migraine, presence or absence of aura, total days of headache/90 days, medication consumption, migraine disability assessment scale (MIDAS) and six-item headache impact test (HIT-6) scale, alcohol consumption, smoking habit, hypertension, hyperlipidemia, and contraceptive use.

Procedure

Peripheral blood samples were drawn in ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) vacutainer tubes from subjects' antecubital veins. DNA was isolated from EDTA whole blood using a REALPURE "SSS" Kit (Durviz SL, Valencia, Spain) following the manufacturer's protocol, aliquoted and stored at -20°C until use. DNA concentrations were quantified using a Nanovue Plus spectrophotometer from GE HealthCare (Connecticut, USA). After quantification, bisulfite conversion was performed with "EZ DNA Methylation-Gold"™ Kit (Zymo Research, Irvine, California, USA) in accordance with the manufacturer's protocol, thereby converting all unmethylated cytosines to uracils but leaving methylcytosines unaltered, thereby allowing us to design specific methylation primers. Real-time quantitative methylation-specific PCR (RT-QMSP) amplification was then carried out with TB Green™ Premix Ex Taq™ II (TaKaRa Bio Inc., Japan) following the manufacturer's instructions using 5-ng template DNA. CpG sites were determined by the European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) CpG plot tool (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) using the gene sequence obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). For these CpG sites, methylation-specific primers were designed on the MethPrimer tool (<https://www.urogene.org/methprimer/>).¹⁹ Each PCR plate included patient samples (analyzed by age- and sex-matched triplets of CM, EM, and HC), serial dilutions of completely methylated DNA for constructing calibration curves, positive controls, and two wells with water blanks used as negative controls. Amplification conditions were as follows: denaturalization at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 30 s, and finally 72°C for 7 min. These reactions were run in duplicate on a StepOnePlus

Table 1. Demographics and clinical characteristics for the different groups.

	CM, N = 109	EM, N = 98	HC, N = 98	p Value
Female, n (%)	97 (89)	89 (91)	88 (90)	ns
Age ^a	42.22 ± 10.6	41.60 ± 10.9	41.6 ± 10.6	ns
Age at onset ^a	16.39 ± 9.6	19.02 ± 10.3	N/A	0.088
HIT-6 ^a	62.83 ± 12.56	58.44 ± 8.9	N/A	0.032
MIDAS ^a	66.68 ± 65.79	17.17 ± 26.5	N/A	<0.001
Days with headache/term ^{a,b}	47.9 ± 27.1	16.7 ± 22.4	N/A	<0.001
Migraine aura ^c	26	22	N/A	ns
Hypertension	9	4	2	ns
Hyperlipidemia	12	13	14	ns
Smoke	29	24	26	ns
Alcohol	20	20	15	ns
Medication abuse headache	22	3	N/A	<0.001
Contraceptives	8	25	20	0.001

HIT-6: six-item headache impact test; MIDAS: migraine disability assessment scale; SD: standard deviation; CM: chronic migraine; EM: episodic migraine; HC: healthy controls.

^aMean ± SD.

^bTerm = 90 days.

^cRefers to predominantly migraine with aura.

System (Applied Biosystems, San Francisco, California, USA) to confirm reliability of the results. DNA methylation levels were calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method²⁰ using StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems).

Selected CpG sites

NPTX2. We analyzed a 662 bp CpG site located on chromosome 7 between positions 98617333 and 98617995 in NPTX2 gene exon 1. The primers selected by the MethPrimer software allowed amplifying a region of 109 bp within this CpG site.

SH2D5. We analyzed a 222 bp CpG site located on chromosome 1 between positions 20732592 and 20732369 of the 5' UTR upstream of the SH2D5 gene. The primers selected by the MethPrimer software allowed amplifying a region of 203 bp within this CpG site. This fragment includes an open reading fragment which could lead to an alternative protein.

Statistics

For all statistics, we used SPSS (IBM Corp., v.21.0. Armonk, New York, USA). Data are presented as mean ± standard deviation for normal variables, and median and interquartile range for non-normal variables. Categorical variables were compared using χ^2 method or Fisher's exact tests (if cell $n < 5$). Quantitative variables were tested for normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test and compared using *t*-test for independent samples, under normal distribution; otherwise, the Kruskal–Wallis method or Mann–Whitney *U* test for comparison of two samples were used. Bivariate correlations of normal variables were performed with Pearson's *r*-test or Spearman's *rho* test for

non-normal variables. We also conducted a multinomial regression modeling using clinical categories as dependent variable (HC as reference subgroup), and methylation degree of SH2D5 and NPTX2, age and sex as independent variables. Regression estimates were given as regression coefficients, odds, and 95% confidence interval. For all tests, $\alpha = 0.05$; a two-sided $p < 0.05$ was defined as statistically significant after Bonferroni correction for multiple testing. As there were not similar reports using our methodology, we could not perform sample size calculation.

Results

We recruited 305 subjects: 109 CM (mean age = 42.2 ± 10.6 years), 98 EM (mean age = 41.6 ± 10.9 years), and 98 HC (mean age = 41.6 ± 10.6 years). Clinical characteristics are summarized in Table 1. We found that CM patients trended to be slightly younger at age of onset of migraine than EM patients (−2.63 years for the difference, $p = 0.088$). CM patients were clearly more disabled than EM according to the results of impact tests MIDAS and HIT-6, number of headache days, and proportion of medication abuse headache. The proportion of patients having vascular risk factors was similar among clinical groups, except for the use of contraceptives, something more frequent among EM females (see Table 1).

We found no significant differences in methylation level among CM, EM, and controls in the 5' upstream region of the SH2D5 gene and in exon 1 of the NPTX2 gene (Table 2).

We did, however, find a low correlation between methylation level in exon 1 of the NPTX2 gene and age ($r = 0.266$; $p < 0.005$) (Figure 1(a)). Correlation between methylation level of 5'upstream region of SH2D5 gene and age was not significant ($r = 0.098$; $p = 0.135$) (Figure 1(b)). Since age could be correlated with

Table 2. Methylation degree ($\Delta\Delta\text{Ct}$) of the 5' region upstream the SH2D5 gene and in the first exon of the NPTX2 gene with respect to clinical groups.

Gene	CM	EM	HC	p Value
SH2D5 median (IQ)	15.990 (14.4–19.2)	16.970 (14.9–20.8)	16.840 (14.1–20.5)	0.388
NPTX2 median (IQ)	13.499 (11.8–15.3)	13.685 (12.1–14.6)	13.010 (12.0–14.3)	0.561

IQ: interquartile range; SH2D5: SH2 domain containing 5 protein; NPTX2: neuronal pentraxin II protein; CM: chronic migraine; EM: episodic migraine; HC: healthy control.

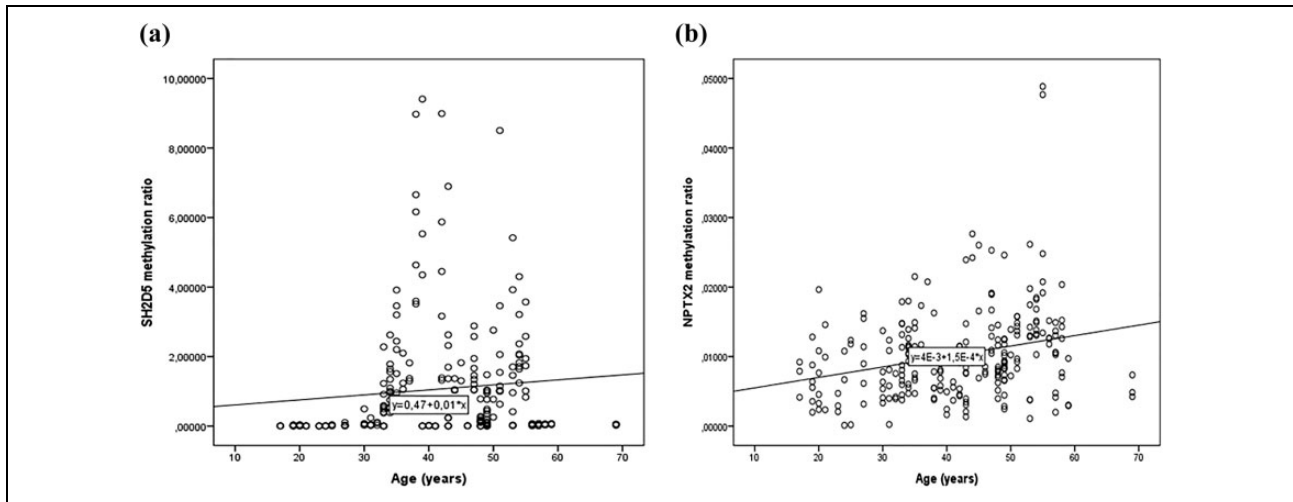


Figure 1. Scatterplots showing (a) no correlation between the methylation level in the 5' upstream region of the SH2D5 gene and age ($r = 0.098$; $p = 0.135$) and (b) low correlation between the methylation level in the first exon of NPTX2 and age ($r = 0.266$; $p < 0.005$). SH2D5: SH2 domain containing 5 protein; NPTX2: neuronal pentraxin II protein.

Table 3. Regression coefficients (β) and odds (OR) and 95% CI corresponding to the multinomial regression model.^a

Category	β	SE	p	OR (95% CI)
CM ^b				
SH2D5	-0.054	0.585	0.926	
NPTX2	0.023	0.135	0.863	1.02 (0.89–1.06)
Age	0.465	0.952	0.625	1.59 (0.61–1.85)
Age	0.004	0.013	0.752	1.00 (0.99–1.03)
EM ^b				
SH2D5	-0.041	0.588	0.945	
NPTX2	-0.156	0.160	0.331	0.85 (0.73–1.11)
NPTX2	0.108	1.048	0.918	1.16 (0.39–1.48)
Age	0.001	0.013	0.943	1.00 (0.98–1.03)

SE: standard error; OR: odds ratio; CI: confidence interval; SH2D5: SH2 domain containing 5 protein; NPTX2: neuronal pentraxin II protein; CM: chronic migraine; EM: episodic migraine.

^aIndependent variables SH2D5, NPTX2, and age were introduced under full factorial model.

^bInterception.

methylation level for exon 1 of NPTX2, age and methylation level of these two genes were analyzed in a multinomial logistic regression model using clinical groups as dependent variables, and NPTX2, SH2D5, and age as covariates. Under this model, none of the covariates differentiated clinical categories (see Table 3). Additionally, we also explored the influence of sex (female as reference) in the model. Both goodness-of-fit (Pearson's $r = 0.330$)

and pseudo- R^2 (McFadden = 0.003) were identical in both models as well coefficient estimates (data not shown).

Discussion

In the present study, we performed a DNA methylation analysis, the best known epigenetic mechanism. DNA methylation occurs mainly in the CpG dinucleotides (CpGs)¹³ that are underrepresented in the human genome, and appear mostly methylated, except in the so-called CpG islands (CpGi), regions with a high density of such CpGs, highly enriched in gene promoters and exons.¹³ Differential methylation among individuals and tissues is to be found in these CpGi. Methylation function in promoter CpGi is related to gene silencing by preventing the access of transcriptional machinery, while methylation found in CpGi located in the gene body has been linked to increased gene expression.²¹ Despite incipient data suggesting that some single CpG dinucleotide methylation correlates with gene expression in some cellular types,²² DNA methylation function has typically been related to the density of methylated CpGs in the region.¹⁶ Therefore, analysis of the average methylation level of a CpG rich region (CpG site) could be expected to be informative of the degree of epigenetic regulation. To this end, RT-QMSP has shown to be a sensitive and specific technique.²³

We conducted a case-control study in a sex- and age-matched sample of CM, EM, and HC, in which we analyzed the methylation level of two CpG related to SH2D5 and NPTX2 genes, as had been suggested by Winsvold et al.¹⁷ to play some role in headache chronification, and we found no differential methylation among clinical categories. Winsvold et al.¹⁷ conducted a follow-up study, comparing 36 females who progressed from episodic to CH over a period of 11 years and 35 controls who remained episodic. This type of study would be more appropriate to suggest epigenetic mechanisms of disease than our cross-sectional study. However, the questionnaire-based assessment they used could not accurately enable distinguishing cases of CM from other types of CH. Although the most prevalent group within CH was CM,⁴ an investigation of a possible epigenetic modification of these two genes in a clearly defined sample of CM was necessary. In addition, it must be taken into account that aging itself could influence the methylation level of a gene.²⁴ In order to minimize this confounding factor, we used an age-matched sample while a multinomial logistic regression model was carried out using age and methylation levels as covariates.

Our strengths are an accurate clinical diagnosis, made by two skilled neurologists (AO and VGQ), conforming to the International Headache Society criteria,¹⁸ and our sample consisted of three sex- and age-matched groups. We applied a different methodology, which could support additional evidence of association in case of positive replication.

Our study also has some limitations: First, given that a gene expression study was not carried out, we cannot know the functional status of these two genes, so we can only suggest an absence of differential epigenetic markers in the analyzed regions in chronic migraineurs versus episodic or HC cases. Second, since it is a cross-sectional study and epigenetic markers are dynamic,¹² we cannot exclude a possible epigenetic change in some evolutionary phase of the disease. Finally, as with all epigenetic studies in neurological diseases based on peripheral blood samples, some controversy exists concerning the correlation with epigenetic changes in brain tissue. Although, ideally, samples of the most relevant tissue for the disease under study should be used, analyzing brain tissue in humans is a well-known difficult task. Hence, the use of accessible tissues such as peripheral blood is acceptable, all the more reason in systemic diseases where epigenetic variations could more likely transcend the brain tissue.²⁴ Furthermore, interindividual variation in DNA methylation patterns seems to have a much smaller contribution to global differences than variation among tissues, so peripheral blood samples are accepted for comparisons among individuals.²⁵

Conclusions

Despite the potential involvement of neuroplasticity genes in CM, we found no differential methylation in the first

exon of the NPTX2 gene nor in the 5'upstream region of the SH2D5 gene in our CM sample. CM is a more heterogeneous clinical diagnosis than desired for which an epigenetic marker remains elusive. More studies are needed to assess functional pathway markers that could be epigenetically modified in CM due to their potential diagnostic and therapeutic implications.

Key Findings

1. We found no significant differences in the methylation level in the first exon of the NPTX2 gene nor in the 5'upstream region of the SH2D5 gene between CM, EM, and HC.
2. CM is a more heterogeneous clinical diagnosis than desired for which an epigenetic marker remains elusive.
3. Standardization of the design of methylation studies is required in order to investigate the existence of possible epigenetic biomarkers of CM.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was financially supported by the Carlos III Health Institute, Madrid, Spain (grant ISCIII-FISS PI15/01285) and the Marqués de Valdecilla Research Institute (IDIVAL), Santander, Spain.

ORCID iD

Agustín Oterino  <https://orcid.org/0000-0002-7457-9129>

References

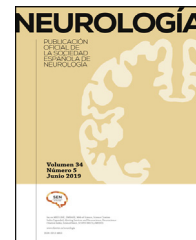
1. Matías-Guiu J J V, et al. One-year prevalence of migraine in Spain: a nationwide population-based survey. *Cephalalgia* 2011; 31: 463–470.
2. Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD, et al. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *JAMA* 1992; 267: 64–69.
3. Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, et al. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* 2001; 41: 646–657.
4. Natoli JL, Manack A, Dean B, et al. Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia* 2010; 30: 599–609.
5. Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, et al. Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol* 2007; 6: 521–532.

6. Gormley P, Anttila V, Winsvold BS, et al. Meta-analysis of 375,000 individuals identifies 38 susceptibility loci for migraine. *Nat Genet* 2016; 48: 856–866.
7. Chasman DI, Schürks M, Anttila V, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet* 2011; 43: 695–698.
8. Ran C, Graae L, Magnusson PKE, et al. A replication study of GWAS findings in migraine identifies association in a Swedish case-control sample. *BMC Med Genet* 2014; 15: 38.
9. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet* 2013; 45: 912–917.
10. Sintas C, Fernández-Morales J, Vila-Pueyo M, et al. Replication study of previous migraine genome-wide association study findings in a Spanish sample of migraine with aura. *Cephalalgia* 2015; 35: 776–782.
11. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet* 2012; 44: 777–782.
12. Eising E, Datson NA, van den Maagdenberg AMJM, et al. Epigenetic mechanisms in migraine: a promising avenue? *BMC Med* 2013; 11: 26.
13. Jirtle RL and Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 253–262.
14. Guo JU, Ma DK, Mo H, et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1345–1351.
15. Gerring ZF, McRae AF, Montgomery GW, et al. Genome-wide DNA methylation profiling in whole blood reveals epigenetic signatures associated with migraine. *BMC Genomics* 2018; 19: 69.
16. Terlizzi R, Bacalini MG, Pirazzini C, et al. Epigenetic DNA methylation changes in episodic and chronic migraine. *Neurol Sci* 2018; 39(Suppl 1): 67–88.
17. Winsvold BS, Palta P, Eising E, et al. Epigenetic DNA methylation changes associated with headache chronification: a retrospective case-control study. *Cephalalgia* 2018; 38: 312–322.
18. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013; 33: 629–808.
19. Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18: 1427–1431.
20. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 2001; 25: 402–408.
21. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 484–492.
22. Lioznova AV, Khamis AM, Artemov AV, et al. CpG traffic lights are markers of regulatory regions in human genome. *BMC Genomics* 2019; 20: 102.
23. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 9821–9826.
24. Yan H, Tian S, Slager SL, et al. Genome-wide epigenetic studies in human disease: a primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol* 2016; 183: 96–109.
25. Hannon E, Lunnon K, Schalkwyk L, et al. Interindividual methylomic variation across blood, cortex, and cerebellum: implications for epigenetic studies of neurological and neuropsychiatric phenotypes. *Epigenetics* 2015; 10: 1024–1032.



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



ORIGINAL

Frecuencia e impacto del trastorno por estrés postraumático y los eventos vitales traumáticos en pacientes con migraña

S. Pérez-Pereda^a, M. Toriello^a, C. Bailón^a, O. Umaran Alfageme^b, F. Hoyuela^c,
V. González-Quintanilla^a y A. Oterino^{d,*}

^a Servicio de Neurología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla e Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL, Santander, Cantabria, España

^b Hospital de Día, Centro de Orientación y Tratamiento de Adicciones, Vitoria, Álava, España

^c Servicio de Psiquiatría, Hospital Sierrallana, Torrelavega, Cantabria, España

^d Servicio de Neurología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España

Recibido el 18 de febrero de 2021; aceptado el 4 de julio de 2021

PALABRAS CLAVE

Migraña crónica;
Trastorno por estrés
postraumático;
Eventos vitales
traumáticos;
Comorbilidades;
Migraña refractaria;
Violencia sexual

Resumen

Introducción: El trastorno por estrés postraumático (TEPT) se ha postulado como un factor de cronificación de la migraña. Nuestro objetivo fue investigar la frecuencia del TEPT y los eventos vitales traumáticos (ET) en pacientes con migraña episódica (ME) y crónica (MC) y su impacto sobre parámetros clínicos, otras comorbilidades y biomarcadores de migraña.

Material y métodos: Se reclutó a pacientes con ME y MC según CIC-3β en una Unidad de Cefaleas y un centro de Atención Primaria. Se utilizaron cuestionarios validados para investigar TEPT, ET, síntomas autonómicos craneales, comorbilidades (depresión, ansiedad, fatiga), discapacidad, impacto de la migraña y calidad de vida. Se determinaron los niveles séricos basales de CGRP, VIP y PACAP por ELISA.

Resultados: Ciento dieciséis pacientes fueron incluidos: 35 ME y 81 MC; 19 sufrían migraña refractaria (MR). Se detectó TEPT en 23 casos (19,8%): 20 MC y 3 ME (χ^2 $p=0,046$; T de Fisher $p=0,073$). La frecuencia de ningún ET ni el número de ET por paciente fue diferente entre MC y ME; 5/19 MR habían sufrido violación (vs. 2/97 no MR; $p=0,002$). El TEPT se asoció con más síntomas autonómicos, mayor puntuación en escalas de ansiedad, depresión y fatiga, y menor calidad de vida, y no modificó los niveles de neuropéptidos.

Conclusiones: Este estudio sugiere que el TEPT es frecuente en pacientes con migraña, especialmente MC, también en nuestro medio, y que particularmente el antecedente de violencia

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: agustin.oterino@gmail.com (A. Oterino).

<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2021.07.006>

0213-4853/© 2021 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Neurología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Chronic migraine;
Post-traumatic stress
disorder;
Traumatic life events;
Comorbidities;
Refractory migraine;
Sexual violence

sexual es frecuente en MR. El TEPT impacta negativamente sobre la migraña, asociando más comorbilidades y peor calidad de vida, por lo que es preciso investigarlo en estos pacientes. © 2021 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Neurología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Frequency and impact of post-traumatic stress disorder and traumatic life events in patients with migraine

Abstract

Introduction: Post-traumatic stress disorder (PTSD) has been proposed as a risk factor for migraine chronification. The aim of this study was to investigate the frequency of PTSD and traumatic life events (TE) in patients with episodic migraine (EM) and chronic migraine (CM) and their impact on clinical parameters, other comorbidities, and migraine biomarkers.

Material and methods: Patients with EM and CM ICHD-3Beta according to the International Classification of Headache Disorders (third edition; beta version) were recruited at a headache unit and a primary care centre. We used validated questionnaires to investigate PTSD, TE, cranial autonomic symptoms, comorbidities (depression, anxiety, and fatigue), disability, migraine impact, and quality of life. Baseline serum levels of CGRP, VIP, and PACAP were determined by ELISA.

Results: The study included 116 patients: 35 with EM and 81 with CM. Nineteen presented refractory migraine (RM). PTSD was detected in 23 patients (19.8%): 20 with CM and 3 with EM (chi-square: $P=.046$; Fisher $T: P=.073$). Neither the frequency of any TE nor the number of TEs per patient were different between CM and EM. A total of 5/19 patients with RM had experienced sexual violence (vs 2/97 with non-RM; $P=.002$). PTSD was associated with more autonomic symptoms; higher scores on anxiety, depression, and fatigue scales; and poorer quality of life; and it did not change neuropeptide levels.

Conclusions: Our results suggest that PTSD is frequent in patients with migraine, and especially CM, in our setting; history of sexual violence is particularly frequent in patients with RM. PTSD has a negative impact on migraine, with higher numbers of comorbidities and poorer quality of life; therefore, further research is needed in this patient group.

© 2021 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Neurología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La migraña es una enfermedad neurológica que cursa en forma de crisis de cefalea de carácter incapacitante y que se sitúa entre las primeras enfermedades en términos de años vividos con discapacidad¹. Según la frecuencia de presentación se puede clasificar en migraña episódica (ME) o crónica (MC)². Los pacientes con MC presentan una mayor discapacidad^{3,4} no solo debido a la elevada frecuencia de los ataques, sino a que presentan con mayor frecuencia comorbilidades que empeoran el pronóstico de la enfermedad^{4,5}. Entre estas comorbilidades se encuentran los factores de riesgo vascular y algunas enfermedades respiratorias y psiquiátricas^{4,5}. De las últimas, la migraña se ha asociado con el trastorno depresivo mayor, el trastorno bipolar y los trastornos de ansiedad⁵. Un exhaustivo estudio americano reflejó que los pacientes con MC tienen el doble de riesgo de sufrir ansiedad y depresión a lo largo de la vida que los pacientes con ME⁴. Aunque la asociación con ansiedad y depresión han sido las más estudiadas, se han sugerido otras sobre las que existe un menor nivel de evidencia, como el trastorno por estrés postraumático (TEPT).

Algunos investigadores han encontrado una mayor frecuencia de TEPT en migrañosos que en la población general y han propuesto su influencia en la cronificación de la migraña⁶⁻⁸. Se ha demostrado, además, que la presencia de TEPT incrementa considerablemente la carga de enfermedad^{6,9}.

No está claro si la mera exposición a un evento traumático (ET) se asocia también con el riesgo de sufrir migraña. La vivencia de un ET es una condición necesaria para el desarrollo de un TEPT, el cual se caracteriza por síntomas intrusivos, conductas de evitación y alteraciones negativas en la cognición y el humor, que suelen aparecer en los 3 primeros meses tras el trauma, pero puede haber un lapso temporal de meses o años antes de que los síntomas se pongan de manifiesto¹⁰. Sin embargo, la exposición a un ET no es suficiente para sufrir un TEPT, como demuestran los estudios epidemiológicos en los que la prevalencia de un ET a lo largo de la vida en la población general oscila desde un 39,1% hasta un 89,6%¹¹, mientras que la prevalencia del TEPT varía entre un 1 y un 12,3% según el medio en el que se evalúe¹². Algunos estudios retrospectivos han encontrado una asociación entre ET infantiles y el desarrollo de migraña en la edad adulta, existiendo además una relación entre dichos ET y la

gravedad de la migraña^{13,14}. Otros autores, por el contrario, han sugerido que esta asociación ocurre únicamente ante ET repetidos¹⁵ y otros incluso que ni la exposición a un ET ni el número de ET, únicamente el TEPT, se asocia con el diagnóstico de migraña⁸.

La migraña se diagnostica por criterios clínicos², pero en los últimos años se ha avanzado en el estudio de posibles biomarcadores plasmáticos que podrían ayudar tanto al diagnóstico, como al seguimiento y el tratamiento de la enfermedad. El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) es el neuropéptido que ha demostrado por el momento ser mejor candidato como biomarcador de la MC¹⁶. Otros, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), que también han sido estudiados, no han demostrado tan buenos resultados¹⁶.

Nuestro objetivo principal fue investigar la frecuencia del TEPT y los ET en pacientes con migraña y las diferencias entre MC y ME. Como objetivo secundario nos propusimos evaluar el impacto del TEPT sobre variables clínicas, otras comorbilidades y biomarcadores de la migraña.

Material y métodos

Realizamos un estudio de corte transversal en pacientes con MC y ME según la tercera Clasificación Internacional de las Cefaleas versión β (CIC-3 β)², que fueron reclutados en una Unidad de Cefaleas (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria) y un centro de Atención Primaria (AP) (Centro de Salud Camargo Costa, Camargo, Cantabria), de forma consecutiva, entre marzo del 2016 y mayo del 2019. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Cantabria y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de su participación. Los criterios de inclusión fueron pacientes entre 18 y 65 años con ME o MC de al menos un año de evolución. Se excluyó a pacientes con cefaleas de características migrañosas de origen secundario o cuyos calendarios de cefaleas aportaban insuficiente información clínica con respecto a los últimos 3 meses. Se definió la migraña refractaria (MR) según los criterios de la Federación Europea de Cefaleas como aquella migraña que ha fallado a todos los tratamientos preventivos disponibles y en la que hay al menos 8 días al mes de dolor de cabeza debilitante durante al menos 6 meses consecutivos¹⁷. En los pacientes que accedieron a participar en el estudio se investigó la frecuencia del TEPT y los ET, síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea, las comorbilidades como la ansiedad, la depresión y la fatiga, percepción de la calidad de vida, y discapacidad e impacto de la migraña, mediante cuestionarios validados (tabla 1) que fueron administrados en una consulta programada con este objetivo. El equipo multidisciplinar estaba integrado por 2 neurólogos expertos en cefaleas y 2 psicólogos clínicos.

Descripción de los cuestionarios

MINI-Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional. Es una entrevista estructurada dividida en módulos que se identifican por letras y que exploran los principales trastornos

Tabla 1 Cuestionarios utilizados para la valoración de la discapacidad e impacto de la migraña, calidad de vida, TEPT, ET y comorbilidades

Variable a estudio	Escala utilizada
Discapacidad	MIDAS
Impacto de la migraña	HIT-6
Calidad de vida	SF-12
TEPT	MINI
ET	TQ
Depresión	BDI
Ansiedad	BAI
Fatiga	Escala de severidad de la fatiga

BAI: inventario de ansiedad de Beck; BDI: inventario de depresión de Beck; ET: eventos traumáticos; HIT-6: test de impacto de la cefalea; MIDAS: escala de discapacidad de la migraña; MINI: Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional; SF-12: cuestionario de salud SF-12; TEPT: trastorno por estrés postraumático, TQ: cuestionario para experiencias traumáticas.

psiquiátricos del eje I del DSM-IV¹⁸. El módulo I explora los síntomas de TEPT en el último mes y sus propiedades psicométricas se consideran válidas para su uso tanto en la práctica clínica como en investigación¹⁸.

Cuestionario para experiencias traumáticas (TQ). Consta de 3 apartados: el primero, de 18 ítems, investiga la experiencia de ET a lo largo de la vida, la edad a la que ocurrieron y su duración; el segundo apartado, de 9 ítems, explora las características del evento marcado por el paciente como el más desagradable, y el tercer apartado, evalúa las consecuencias de dicho evento, en cualquier momento después del suceso, a través de 18 ítems ligados a los criterios de TEPT del DSM-IV¹⁹. La versión española de este cuestionario ha demostrado unas adecuadas propiedades psicométricas²⁰.

Inventario de ansiedad de Beck (BAI). Es un inventario que consta de 21 ítems que exploran los síntomas somáticos de la ansiedad²¹. Los pacientes indican cuánto les ha molestado cada uno de los síntomas en la última semana. Las respuestas van desde 0 (nada) a 3 (severamente). La puntuación final es la suma de la puntuación de cada uno de los ítems, que va desde 0 a 63.

Inventario de depresión de Beck (BDI). Está compuesto por 21 categorías de síntomas y actitudes, que exploran las manifestaciones típicas de la depresión, calificadas del 0 al 3 para indicar el grado de severidad de cada síntoma. Estas categorías cubren los criterios diagnósticos de la depresión según el DSM-IV y la puntuación total va de 0 a 63 puntos. Es uno de los cuestionarios más utilizados para medir depresión²².

Síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea. Utilizamos un cuestionario breve que interroga sobre síntomas autonómicos craneales (sensación de plenitud facial u ocular, lagrimeo, enrojecimiento del ojo o de la cara, ptosis, sensación de arenilla en el ojo, congestión nasal o rinorrea) antes o durante la cefalea y que el paciente debe responder si le ocurren nunca, alguna vez o a menudo.

Escala de severidad de la fatiga. Consiste en 9 ítems, seleccionados de entre las características definitorias de la fatiga, en las que el individuo debe expresar su grado de

acuerdo con una puntuación del 1 (totalmente de acuerdo) al 7 (totalmente en desacuerdo)²³.

Cuestionario de salud SF-12. Es una versión reducida del cuestionario de salud SF-36, que a través de 12 ítems explora la salud física y mental en referencia a las últimas 4 semanas²⁴.

Escala para la evaluación de la discapacidad de la migraña (MIDAS). Es una de las escalas más utilizadas para medir la discapacidad asociada a la migraña²⁵. Incluye 5 preguntas sobre limitaciones en diferentes aspectos de la vida cotidiana (laborales, tareas domésticas, actividades sociales, familiares o lúdicas) en un periodo de 3 meses.

Test de impacto de la cefalea (HIT-6). Es un cuestionario de 6 ítems, que cubre varias áreas de impacto como son el dolor, las limitaciones sociales, el funcionamiento cognitivo, el sufrimiento psicológico y la vitalidad, y que ha demostrado ser fiable para el cribado y la monitorización del impacto de las cefaleas²⁶.

Determinación de los neuropéptidos séricos

Se determinaron los niveles séricos de los neuropéptidos CGRP, VIP y PACAP en sangre periférica. Los pacientes de estudio fueron citados en la consulta de cefaleas para la extracción de muestras de 5 ml de sangre de la vena cubital en condiciones de ayunas. Los pacientes debían encontrarse en un periodo libre de migraña desde al menos 72 h antes. Las muestras fueron recogidas en tubos BD Vacutainer® sin EDTA (Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, New Jersey, USA), centrifugadas a temperatura ambiente y 3.500 revoluciones en menos de 10 min desde su extracción, posteriormente alicuotadas y almacenadas en congelador a -80°C hasta su uso. El análisis de dichas muestras se realizó mediante kits de ELISA comercialmente disponibles: Blue-Gene Biotech Co kit (Pudong New District, Shanghai) para PACAP y Cloud-Clone Corp kit (Wuhan, China) para CGRP y VIP, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los rangos de detección de los kits fueron 12,35-1.000 pg/ml para CGRP, 6,17-500 pg/ml para VIP y 0-1.000 pg/ml para PACAP. Este procedimiento forma parte de otro estudio que fue diseñado con el objetivo de evaluar el valor diagnóstico de estos neuropéptidos en migraña y cuyos resultados han sido previamente publicados²⁷.

Análisis estadístico

Utilizamos como estadísticos descriptivos la media y la desviación estándar para variables con distribución normal, y la mediana y el rango intercuartílico para variables con distribución no normal. Las variables cuantitativas con distribución normal se compararon usando el T test y las de distribución no normal mediante el test U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se compararon con el test de la χ^2 o el test exacto de Fisher si $n < 5$. La correlación entre 2 variables se estudió mediante el test rho de Spearman para variables con distribución no normal. Para todas las comparaciones, se asumió un valor $\alpha = 0,05$.

Resultados

Descripción de la muestra

Se incluyó a 116 pacientes en el estudio, 81 con MC y 35 con ME. Existía un claro predominio femenino, siendo el 91% (106/116) de la muestra mujeres. No hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a la distribución del sexo ni la edad entre los grupos. Un total de 19 pacientes en el grupo MC cumplían criterios de MR, 30 de los pacientes con MC presentaban cefalea por abuso de medicación (tabla 2).

Los pacientes con MC puntuaron más alto en la escala MIDAS ($71,05 \pm 71$ vs. $22,71 \pm 36,2$ en ME; $p < 0,001$) que los pacientes con ME, pero no hubo diferencias significativas en la escala HIT-6. Los pacientes con MC puntuaron también más alto en las escalas de ansiedad (18 [8-28] vs. 9 [5-14]; $p = 0,025$) y de fatiga (47 [34-60] vs. 23 [15-48]; $p < 0,001$), mientras que no hubo diferencias significativas en la escala de depresión. Los pacientes con MC reconocieron sufrir más síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea (5 [1,7-7,0] vs. 1,5 [0-3]; $p < 0,001$). Los niveles séricos interictales de CGRP, VIP y PACAP fueron significativamente superiores en los pacientes con MC vs. ME (CGRP en MC = 19,771 [15,12-27,82] vs. ME = 12,785 [10,08-18,35]; VIP en MC = 137,414 [92,95-189,36] vs. ME = 63,586 [41,26-114,86], y PACAP en MC = 334,729 [117,67-640,62] vs. ME = 98,703 [69,16-142,25], $p < 0,001$ para todas las comparaciones) (tabla 2).

Frecuencia del TEPT y los ET

Un total de 23 pacientes de los 116 (19,8%) cumplían los criterios de TEPT en el último mes. De ellos, 20 pacientes (87%) presentaban MC y 3 (13%) ME, existiendo una tendencia hacia la mayor frecuencia de TEPT en pacientes con MC ($\chi^2 3,995$, $p = 0,046$; test exacto de Fisher $p = 0,073$) (tabla 2) (fig. 1).

Setenta y cinco pacientes del total (64,7%) reconocieron haber sufrido algún ET a lo largo de su vida, no existiendo diferencias entre los pacientes con MC y ME (49 MC vs. 26 ME; $\chi^2 2,034$, $p = 0,350$) (tabla 2). El ET más frecuente fue el fallecimiento inesperado de un ser querido, que fue informado en 53 casos (34 MC y 19 ME; $p = 0,222$).

No se observaron diferencias significativas en el tipo ni en el número total de ET vividos por paciente entre aquellos con MC y ME ($\chi^2 7,806$, 7 g.l., $p = 0,350$). Sí que hubo diferencias entre los pacientes con y sin TEPT. Los pacientes con TEPT en el último mes habían presentado con más frecuencia la amenaza seria o daño a un miembro de la familia o amigo íntimo (6/23 vs. 5/93; $p = 0,008$), abusos físicos (9/23 vs. 6/93; $p < 0,001$) y violación (4/23 vs. 3/93; $p = 0,028$). Los pacientes sin TEPT en el último mes referían con mayor frecuencia haber vivido un accidente de coche, tren o avión (20/93 vs. 11/23; $p = 0,011$), la muerte inesperada de un ser querido (35/93 vs. 18/23; $p = 0,001$) y haber estado próximos a ahogarse (10/93 vs. 7/23; $p = 0,025$). No hubo diferencias en la frecuencia del resto de los ET.

Se realizó un subanálisis de los ET tras estratificar a los pacientes según la refractariedad de la migraña (tabla 3). Observamos que el número total de ET sufridos por paciente

Tabla 2 Características demográficas, clínicas, comorbilidades y niveles de neuropéptidos séricos de los pacientes con MC y ME

	MC (n = 81)	ME (n = 35)	p
Edad (años) ^a	44 (36,5-51,0)	44 (33,0-50,5)	0,592
Sexo femenino, n (%)	73 (90,1%)	33 (94,3)	0,463
Días de cefalea/90 días	47,66 ± 26,9	16,66 ± 22,4	< 0,001
MR, n (%)	19 (23,5)	0	< 0,001 ^c
CAM, n (%)	30 (37)	0	< 0,001 ^c
MIDAS ^a	71,05 ± 71,0	22,71 ± 36,2	< 0,001
HIT-6 ^a	59,17 ± 9,0	62,12 ± 13,6	0,342
BDI ^b	12 (7-24)	9 (5-14)	0,128
BAI ^b	18 (8-28)	9 (5-14)	0,025
Fatiga ^b	47 (34-60)	23 (15-48)	< 0,001
Síntomas autonómicos ^b	5 (1,75-7,0)	1,5 (0-3,0)	< 0,001
TEPT actual, n (%)	20 (25)	3 (8,6)	0,046
			0,073 ^c
Al menos 1 ET, n (%)	49 (60)	26 (74)	0,350
Edad ET	32,94 ± 15,6	31,21 ± 16,3	0,730
CGRP ^b (pg/ml)	19,771 (15,12-27,82)	12,785 (10,08-18,35)	< 0,001
VIP ^b (pg/ml)	137,414 (92,95-189,36)	63,586 (41,26-114,86)	< 0,001
PACAP ^b (pg/ml)	334,729 (117,67-640,62)	98,703 (69,16-142,25)	< 0,001

BAI: inventario de ansiedad de Beck; BDI: inventario de depresión de Beck; CAM: cefalea por abuso de medicación; DE: desviación estándar; ET: evento traumático; HIT-6: test de impacto de la cefalea; MC: migraña crónica, ME: migraña episódica, MIDAS: escala de discapacidad de la migraña; MR: migraña refractaria; TEPT: trastorno por estrés postraumático.

^a Media ± DE.

^b Mediana y rango intercuartílico.

^c Test exacto de Fisher.

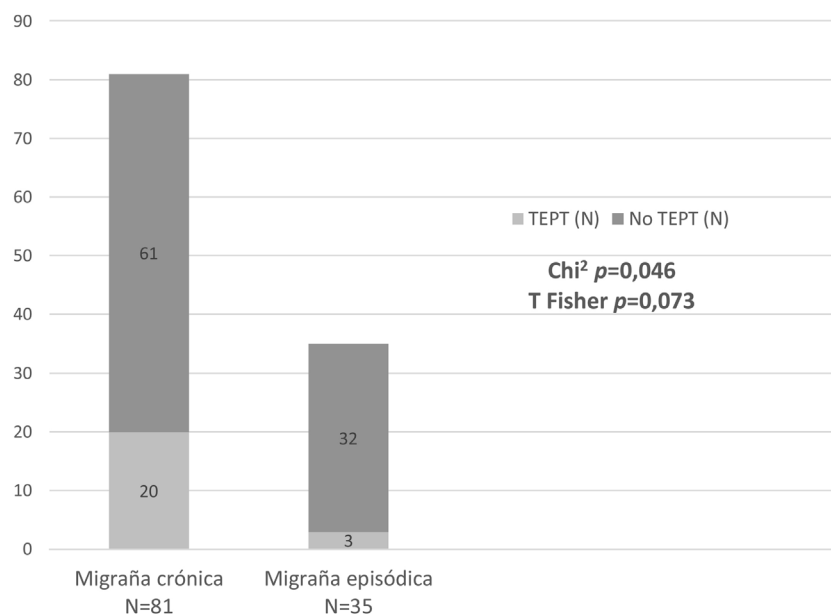


Figura 1 Distribución del TEPT entre los pacientes con MC y ME.

no fue diferente entre aquellos con MR y los que no (χ^2 9,670, 7 g.l.; $p=0,208$). Sin embargo, analizando el tipo de ET, observamos que los pacientes con MR referían haber sufrido violación con mayor frecuencia que los pacientes sin MR. De

los 19 pacientes con MR, 5 (26%) habían sufrido violación, en comparación con 2/97 (2%) que no tenían MR ($p=0,002$). Este acontecimiento ocurrió de media a los $15,9 \pm 9,0$ años, una edad significativamente más precoz que los otros ET

Tabla 3 Distribución de los ET (TQ) entre los pacientes con y sin MR

Acontecimiento	MR N = 19	No MR N = 97	p
1. Accidente de coche, tren o avión	8	23	0,117
2. Accidente industrial o de trabajo	1	3	0,536
3. Pérdida del hogar por un incendio	0	0	N/A
4. Pérdida del hogar o de un miembro de la familia por inundaciones	1	0	0,172
5. Pérdida del hogar o de un miembro de la familia por un tornado o huracán	0	1	0,828
6. Pérdida del hogar o de un miembro de la familia por un terremoto	0	0	N/A
7. Amenaza seria o daño a un miembro de la familia o amigo íntimo	10	1	0,399
8. Muerte inesperada de un miembro de la familia o amigo íntimo	6	47	0,096
9. Estar próximo a ahogarse	2	15	0,733
10. Abuso físico	4	11	0,241
11. Sufrir graves quemaduras	0	2	0,684
12. Ser tomado como rehén	0	0	N/A
13. Combate	0	1	0,828
14. Agresión	3	11	0,448
15. Violación	5	2	0,002
16. Incesto	0	0	N/A
17. Secuestro	0	0	N/A
18. Otros ^a	3	26	0,395

ET: eventos traumáticos; MR: migraña refractaria; TQ: cuestionario para experiencias traumáticas.

^a Esta categoría incluye acoso laboral y escolar.

referidos que ocurrieron de media a los $33,26 \pm 15,58$ a ($p=0,050$). Ningún otro ET aislado fue más frecuente en la MR.

Comparación entre los pacientes con y sin TEPT

Se realizó una comparación de variables clínicas, otras comorbilidades y niveles séricos basales de neuropéptidos implicados en la fisiopatología de la migraña entre los pacientes con y sin TEPT en el último mes (tabla 4).

Encontramos que los pacientes con TEPT puntuaron más alto en las escalas de depresión (16 [11,5-32,5] vs. 12 [5-16,5]; $p < 0,001$), ansiedad (29 [14-37,5] vs. 12 [5-16,5]; $p < 0,001$) y fatiga (60 [53-63] vs. 37 [20-55]; $p < 0,001$) y reconocieron menor calidad de vida en las escalas SF-12 física ($33,30 \pm 10,79$ vs. $41,87 \pm 10,49$; $p=0,001$) y mental ($37,83 \pm 10,20$ vs. $44,45 \pm 11,48$; $p=0,013$). No encontramos diferencias en la frecuencia media de días de cefalea/90 días ni en las puntuaciones de las escalas MIDAS y HIT-6.

Los pacientes con TEPT reconocieron sufrir más síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea (5,0 [3-9,5]) que los pacientes sin TEPT (2,0 [1-6]; $p=0,001$) (tabla 4).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos interictales de CGRP, VIP y PACAP según la presencia de TEPT o no (tabla 4). Los niveles de VIP ($\rho=0,247$; $p=0,011$) y de PACAP ($\rho=0,242$; $p=0,013$) mostraron una correlación positiva con la puntuación de los síntomas autonómicos.

Discusión

La importancia de las comorbilidades radica en la posible existencia de mecanismos fisiopatológicos comunes²⁸. En esta línea se ha propuesto que el TEPT tiene consecuencias sobre circuitos neuronales que participan en la respuesta al estrés y que están implicados también en la hiperexcitabilidad cerebral subyacente en la migraña²⁹. Por otra parte, la existencia de estas comorbilidades alberga la posibilidad de que identificando y abordando el TEPT de una manera específica pueda mejorar el pronóstico de la migraña, como se ha descrito en otras condiciones de dolor crónico³⁰.

En este estudio hemos investigado la frecuencia del TEPT, mediante la entrevista MINI que evalúa la presencia de síntomas en el último mes, en una muestra de pacientes con migraña reclutados en una consulta de Cefaleas y una consulta de AP, y hemos encontrado unas cifras superiores (19,8%) a las encontradas en la población general. En un gran estudio poblacional americano se observó una prevalencia de TEPT en el último año de entre un 2-5%, según el medio y el grupo de edad¹², mientras que en España se ha encontrado una prevalencia general del 0,6%³¹. La proporción de TEPT detectada en nuestro estudio en pacientes con migraña es similar a la informada en otros trabajos que investigaron el TEPT en este grupo de población (25%)^{6,8} y es aproximadamente el doble que en los controles sin migraña⁸. Los estudios previos fueron realizados mayoritariamente en EE. UU, donde la prevalencia del TEPT es mayor que en nuestro país, y esto podría condicionar un sesgo local. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las cifras son similares en

Tabla 4 Diferencias clínicas, comorbilidades y niveles basales de neuropéptidos séricos entre los pacientes con y sin TEPT

	TEPT actual (N = 23)	No TEPT actual (N = 93)	p
MC, n (%)	20 (87)	61 (66)	0,046
Edad inicio migraña (años) ^a	15,69 ± 9,2	17,53 ± 11,7	0,073 ^c
MR, n (%)	5 (21,7)	14 (15)	0,438
MIDAS ^a	68,72 ± 77,02	53,79 ± 64,12	0,395
Días de cefalea/90 días ^a	51,80 ± 26,77	38,25 ± 30,28	0,113
HIT-6 ^a	61,54 ± 11,11	61,24 ± 18,83	0,937
BDI ^b	16 (11,5-32,5)	12 (5-16,5)	< 0,001
BAI ^b	29 (14-37,5)	13 (6-22,5)	< 0,001
Fatiga ^b	60 (53-63)	37 (20-55)	< 0,001
Síntomas autonómicos ^b	5,0 (3-9,5)	2,0 (1-6)	0,001
SF-12- física ^a	33,30 ± 10,79	41,87 ± 10,49	0,001
SF-12- mental ^a	37,83 ± 10,20	44,45 ± 11,48	0,013
CGRP ^b (pg/ml)	19,75 (16,7-22,4)	17,42 (12,7-24,2)	0,641
VIP ^b (pg/ml)	130,34 (90,5-189,4)	123,71 (61,9-176,4)	0,352
PACAP ^b (pg/ml)	432,52 (106,3-660,3)	137,16 (94,4-474,7)	0,162

BAI: inventario de ansiedad de Beck; BDI: inventario de depresión de Beck; HIT-6: test de impacto de la cefalea; MC: migraña crónica, ME: migraña episódica, MIDAS: escala de discapacidad de la migraña; SF-12: escala de salud SF-12; TEPT: trastorno por estrés postraumático.

^a Media ± DE.

^b Mediana y rango intercuartílico.

^c Test exacto de Fisher.

nuestros pacientes con migraña y muestran también una frecuente comorbilidad entre estas 2 patologías en nuestro medio.

Además, hemos encontrado una tendencia a la mayor frecuencia del TEPT en el grupo de pacientes con MC (25%) que en ME (8,6%), pero que no alcanza significación con las pruebas estadísticas empleadas. Una mayor frecuencia de TEPT en MC que en ME ha sido descrita en trabajos anteriores, que han informado una frecuencia en MC de hasta un 43%⁷, sugiriendo el papel del TEPT como factor de cronificación de la migraña. En nuestro análisis, un pequeño tamaño de la muestra podría haber limitado la potencia de los resultados.

En cuanto al análisis de los ET, el más frecuente en global en este estudio fue el fallecimiento inesperado de un ser querido, coincidiendo con los resultados de estudios epidemiológicos^{10,31}. Este es un ET con un bajo riesgo condicional de TEPT³¹, como reflejan también nuestros resultados. Algunos ET, como la amenaza seria o el daño a un miembro de la familia o amigo íntimo, los abusos físicos y la violación, fueron más frecuentes en los pacientes con TEPT, indicando un mayor riesgo condicional de TEPT para este tipo de acontecimientos. No observamos diferencias en el número de pacientes que refieren haber sufrido al menos un ET a lo largo de la vida entre MC o ME, coincidiendo con otros autores⁷, y siendo el porcentaje encontrado similar al de la población general, en la que cerca de un 50% relata al menos un ET³¹. No encontramos tampoco ET estadísticamente más frecuentes en el grupo MC que en ME. Sin embargo, encontramos que haber sufrido violación es más frecuente en los pacientes con MR, suponiendo un 26% de los mismos. Este porcentaje es drásticamente superior al de la población general en nuestro país, donde estudios poblacionales muestran que la prevalencia de violencia sexual, que incluye acoso, abusos y violación, es de un 3,4% (en concreto

la prevalencia de violación un 0,4%) y que este es el ET con un mayor riesgo condicional de TEPT en mujeres (16,5%)³¹. En nuestro estudio, este evento ocurrió de media a una edad significativamente más precoz que el resto de los ET. Aunque no está clara la relación entre los ET y el riesgo de migraña, se sabe, que la vulnerabilidad a los efectos de un trauma es mayor a una edad temprana y parece existir una relación entre los ET en la infancia y el desarrollo de algunas psicopatologías y condiciones de dolor crónico en la edad adulta³². En esta línea, algunos estudios retrospectivos han encontrado una asociación entre los ET infantiles y el riesgo de migraña^{13,14}. Las mujeres migrañosas refieren ET (abusos físicos, psíquicos o sexuales, maltrato físico o psicológico, traumas familiares o domésticos) con mayor frecuencia que las no migrañosas y las puntuaciones en los cuestionarios de adversidad se correlacionan con la frecuencia de la migraña, siendo superiores en MC¹⁴.

En este trabajo, los pacientes que sufren TEPT en el último mes puntuaron más alto en las escalas de depresión, ansiedad y fatiga, y peor en las de calidad de vida, coincidiendo con lo encontrado por otros autores^{6,9}, excepto la fatiga, que no ha sido evaluada con anterioridad. En un trabajo que agrupó a los migrañosos según las constelaciones de comorbilidades que presentan, se observó que el grupo de pacientes que asocian ansiedad y depresión ha sufrido con mayor frecuencia abusos sexuales, físicos y emocionales, y este grupo es el que puntúa más alto en las escalas de discapacidad relacionada con la cefalea y peor en las de calidad de vida¹³. Por el contrario, en nuestro estudio, los pacientes con TEPT no tenían más días de cefalea ni puntuaron más alto en las escalas de discapacidad e impacto de la migraña, lo que indica, a la luz de nuestros resultados, que estos pacientes podrían sufrir mayor carga de enfermedad a expensas de más comorbilidades y afectación de la calidad

de vida, pero no a expensas de parámetros específicos de la migraña. No obstante, en nuestro estudio la frecuencia de la cefalea es una variable derivada del MIDAS, que está sujeta a un sesgo de recuerdo respecto a hacer un calendario y esto podría representar un sesgo a la hora de interpretar que no hay diferencias en la frecuencia de días de cefalea entre pacientes con y sin TEPT.

En la misma línea, no hemos encontrado tampoco diferencias en los niveles séricos interictales de CGRP, VIP y PACAP entre los pacientes con y sin TEPT, por lo que no parece existir un impacto directo del TEPT sobre potenciales biomarcadores de la migraña. No hay estudios previos que hayan evaluado las consecuencias del TEPT sobre los niveles de CGRP y VIP, mientras que sí se ha estudiado su relación con PACAP. Este es un péptido parasimpático que desempeña un papel clave en los circuitos neuronales que median la respuesta al estrés³³ y sus niveles plasmáticos han demostrado una correlación positiva con la severidad de los síntomas del TEPT en mujeres³⁴. A diferencia de este último trabajo, en nuestro estudio, aunque la muestra estuvo mayoritariamente formada por mujeres (91%), no se realizó un análisis estratificado según el sexo y el TEPT se evaluó de forma cualitativa (sí/no) y no cuantitativa, no observando diferencias en los niveles basales de PACAP.

En cuanto a los síntomas autonómicos craneales, encontramos que fueron más numerosos en los pacientes con TEPT. Algunos síntomas autonómicos, como el incremento del calor facial³⁵ y la variabilidad en la frecuencia cardíaca y la presión arterial, son habituales en el TEPT³³. Según reflejan nuestros resultados, es posible que estos pacientes presenten también más síntomas autonómicos craneales relacionados con la cefalea que los migrañosos sin TEPT. Sin embargo, esta clase de síntomas son ampliamente reconocidos también por los pacientes con MC³⁶, por lo que la sobrerrepresentación de MC en el grupo de TEPT en nuestro estudio (87%) podría sesgar este resultado. A favor de ello, los niveles séricos tanto de VIP, como de PACAP, péptidos parasimpáticos implicados en la regulación de la respuesta autonómica^{33,37}, se correlacionaron con la cantidad de síntomas autonómicos, pero no se encontraron elevados basalmente en el TEPT, mientras que sí lo estaban en la MC.

Este estudio cuenta con algunas limitaciones. 1) debido a la ausencia de un grupo control, los resultados se han comparado con las cifras de prevalencia de TEPT y ET encontradas en la población general sin migraña, que varían según el medio, y podrían no ser generalizables a la población de nuestra región; en cualquier caso, nuestros resultados son consistentes con los previamente publicados; 2) aunque podría existir un sesgo de participación que sobrestime las cifras de TEPT y ET, la evaluación retrospectiva de los ET está sujeta a un sesgo de recuerdo³², lo que podría compensar, al menos en parte, lo anterior; 3) el tamaño final de la muestra es pequeño, lo cual limita la interpretación de los resultados, no obstante, se han realizado algunas observaciones que sientan las bases para futuros estudios, y 4) en el análisis de los neuropéptidos séricos, son bien conocidas las dificultades metodológicas en la técnica de determinación³⁸, pero cabe destacar que se ha realizado un gran esfuerzo por minimizar los tiempos de procesamiento de las muestras y se han utilizado los mismos kits de ELISA empleados anteriormente por otros autores. Como punto fuerte de este

estudio, se debe destacar la obtención de una parte de la muestra en un centro de AP para evitar el sesgo de selección de los pacientes con migraña más severamente afectados que se atienden habitualmente en las Unidades de Cefaleas.

En conclusión, este estudio aporta nuevos datos que sugieren que el TEPT es frecuente en los pacientes con migraña, especialmente crónica, y que esta es una comorbilidad frecuente también en nuestro medio. En particular, hemos observado que el antecedente de violencia sexual es llamativamente frecuente en los pacientes con MR. La presencia de TEPT, aunque no modifica parámetros específicos de la migraña, impacta de forma negativa en el pronóstico de estos pacientes, al asociarse con más comorbilidades y peor calidad de vida, por lo que es preciso investigarlo y abordarlo de forma específica en la consulta de cefaleas. Estos resultados plantean la necesidad de realizar nuevos estudios, con un mayor tamaño muestral, que aclaren la relación entre el TEPT y los ET, y las formas más graves de migraña.

Financiación

Este trabajo ha recibido financiación del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, (Beca FISS PI15/01285) y Fondos Privados del Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL, Santander.

Conflicto de intereses

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. GBD, 2017 Disease, Injury Incidence, Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond Engl*. 2018;392:1789–858.
2. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia Int J Headache*. 2018;38:1–211.
3. Adams AM, Serrano D, Buse DC, Reed ML, Marske V, Fanning KM, et al. The impact of chronic migraine: The Chronic Migraine Epidemiology and Outcomes (CaMEO) Study methods and baseline results. *Cephalalgia Int J Headache*. 2015;35:563–78.
4. Buse DC, Manack A, Serrano D, Turkel C, Lipton RB. Sociodemographic and comorbidity profiles of chronic migraine and episodic migraine sufferers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81:428–32.
5. Jette N, Patten S, Williams J, Becker W, Wiebe S. Comorbidity of migraine and psychiatric disorders —a national population-based study. *Headache*. 2008;48:501–16.
6. Peterlin BL, Tietjen GE, Brandes JL, Rubin SM, Drexler E, Lidicker JR, et al. Posttraumatic stress disorder in migraine. *Headache*. 2009;49:541–51.
7. Peterlin BL, Tietjen G, Meng S, Lidicker J, Bigal M. Post-traumatic stress disorder in episodic and chronic migraine. *Headache*. 2008;48:517–22.

8. Smitherman TA, Kolivas ED. Trauma exposure versus post-traumatic stress disorder: relative associations with migraine. *Headache*. 2013;53:775–86.
9. Rao AS, Scher AI, Vieira RVA, Merikangas KR, Metti AL, Peterlin BL. The impact of post-traumatic stress disorder on the burden of migraine: Results from the national comorbidity survey-replication. *Headache*. 2015;55:1323–41.
10. Pichot P, López-Ibor Aliño JJ, Valdés Miyar M. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: DSM-IV. Barcelona: Masson;; 2001.
11. Breslau N, Kessler RC, Chilcoat HD, Schultz LR, Davis GC, Andreski P. Trauma and posttraumatic stress disorder in the community: The 1996 Detroit Area Survey of Trauma. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55:626–32.
12. Reynolds K, Pietrzak RH, Mackenzie CS, Chou KL, Sareen J. Post-traumatic stress disorder across the adult lifespan: Findings from a nationally representative survey. *Am J Geriatr Psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry*. 2016;24:81–93.
13. Tietjen GE, Herial NA, Hardgrove J, Utley C, White L. Migraine comorbidity constellations. *Headache*. 2007;47:857–65.
14. Tietjen GE, Khubchandani J, Herial NA, Shah K. Adverse childhood experiences are associated with migraine and vascular biomarkers. *Headache*. 2012;52:920–9.
15. Lee S, Tsang A, von Korff M, de Graaf R, Benjet C, Haro JM, et al. Association of headache with childhood adversity and mental disorder: Cross-national study. *Br J Psychiatry J Ment Sci*. 2009;194:111–6.
16. Riesco N, Cernuda-Morollón E, Pascual J. Neuropeptides as a marker for chronic headache. *Curr Pain Headache Rep*. 2017;21:18.
17. Sacco S, Braschinsky M, Ducros A, Lampl C, Little P, van den Brink AM, et al. European headache federation consensus on the definition of resistant and refractory migraine: Developed with the endorsement of the European Migraine & Headache Alliance (EMHA). *J Headache Pain*. 2020;21:76.
18. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): The development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry*. 1998;59(Suppl 20):22–33 [quiz 34–57].
19. Davidson J, Smith R. Traumatic experiences in psychiatric outpatients. *J Trauma Stress*. 1990;3:459–75.
20. Bobes J, Calcedo-Barba A, García M, François M, Rico-Villademoros F, González MP, et al. [Evaluation of the psychometric properties of the Spanish version of 5 questionnaires for the evaluation of post-traumatic stress syndrome]. *Actas Esp Psiquiatr*. 2000;28:207–18.
21. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties. *J Consult Clin Psychol*. 1988;56:893–7.
22. Richter P, Werner J, Heerlein A, Kraus A, Sauer H. On the validity of the Beck Depression Inventory. A review. *Psychopathology*. 1998;31:160–8.
23. Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol*. 1989;46:1121–3.
24. Vilagut G, María Valderas J, Ferrer M, Garin O, López-García E, Alonso J. Interpretación de los cuestionarios de salud SF-36 y SF-12 en España: componentes físico y mental. *Med Clí (Barc)*. 2008;130:726–35.
25. Lipton RB, Stewart WF, Sawyer J, Edmeads JG. Clinical utility of an instrument assessing migraine disability: The Migraine Disability Assessment (MIDAS) questionnaire. *Headache*. 2001;41:854–61.
26. Kosinski M, Bayliss MS, Bjorner JB, Ware JE, Garber WH, Batenhorst A, et al. A six-item short-form survey for measuring headache impact: The HIT-6. *Qual Life Res Int J Qual Life Asp Treat Care Rehabil*. 2003;12:963–74.
27. Pérez-Pereda S, Toriello-Suárez M, Ocejó-Vinyals G, Guiral-Foz S, Castillo-Obeso J, Montes-Gómez S, et al. Serum CGRP VIP, and PACAP usefulness in migraine: A case-control study in chronic migraine patients in real clinical practice. *Mol Biol Rep*. 2020;47:7125–38.
28. Lipton RB, Silberstein SD. Why study the comorbidity of migraine? *Neurology*. 1994;44(10 Suppl 7):S4–5.
29. Dresler T, Caratozzolo S, Guldolf K, Huhn J-I, Loiacono C, Niiberg-Pikksööt T, et al. Understanding the nature of psychiatric comorbidity in migraine: A systematic review focused on interactions and treatment implications. *J Headache Pain*. 2019;20:51.
30. Muse M. Stress-related, posttraumatic chronic pain syndrome: behavioral treatment approach. *Pain*. 1986;25:389–94.
31. Olaya B, Alonso J, Atwoli L, Kessler RC, Vilagut G, Haro JM. Association between traumatic events and post-traumatic stress disorder: Results from the ESEMeD-Spain study. *Epidemiol Psychiatr Sci*. 2015;24:172–83.
32. Sachs-Ericsson NJ, Sheffler JL, Stanley IH, Piazza JR, Preacher KJ. When emotional pain becomes physical: Adverse childhood experiences pain, and the role of mood and anxiety disorders. *J Clin Psychol*. 2017;73:1403–28.
33. King SB, Toufexis DJ, Hammack SE. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), stress, and sex hormones. *Stress Amst Neth*. 2017;20:465–75.
34. Ressler KJ, Mercer KB, Bradley B, Jovanovic T, Mahan A, Kerley K, et al. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*. 2011;470:492–7.
35. Di Giacinto A, Brunetti M, Sepede G, Ferretti A, Merla A. Thermal signature of fear conditioning in mild post traumatic stress disorder. *Neuroscience*. 2014;266:216–23.
36. Riesco N, Pérez-Alvarez AI, Verano L, García-Cabo C, Martínez-Ramos J, Sánchez-Lozano P, et al. Prevalence of cranial autonomic parasympathetic symptoms in chronic migraine: Usefulness of a new scale. *Cephalalgia Int J Headache*. 2016;36:346–50.
37. Riesco N, Cernuda-Morollón E, Martínez-Cambor P, Pérez-Alvarez AI, Verano L, García-Cabo C, et al. Relationship between serum levels of VIP, but not of CGRP, and cranial autonomic parasympathetic symptoms: A study in chronic migraine patients. *Cephalalgia Int J Headache*. 2017;37:823–7.
38. Edvinsson L, Ekman R, Goadsby PJ. Measurement of vasoactive neuropeptides in biological materials: Problems and pitfalls from 30 years of experience and novel future approaches. *Cephalalgia Int J Headache*. 2010;30:761–6.

