

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD



**TESIS DOCTORAL**

**PAPEL DEL PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE  
LA CALCITONINA EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA  
INTESTINAL Y COVID-19**

**Directores**

Javier Crespo García

Julio Pascual Gómez

**Autora**

Marta Pascual Mato

**ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

**Santander, 2024**



*A mi abuelo Juan*



## AGRADECIMIENTOS

*“La raíz de todo bien crece en la tierra de la gratitud.” Dalai Lama*

Antes de iniciar el contenido de mi tesis doctoral, me gustaría detenerme un momento para agradecer a las personas que han hecho posible este trabajo de una manera o de otra.

Quiero empezar agradeciendo al equipo de enfermedad inflamatoria intestinal de Valdecilla por la inclusión de los pacientes y los inestimables consejos. En especial, quiero agradecer a Marisol, enfermera de consultas de inflamatoria, su ayuda con el reclutamiento y la extracción de las muestras. Gracias por tener esa actitud tan positiva y mantener siempre el entusiasmo todo este tiempo.

A mis directores de tesis, Javier y Julio, por enseñarme que la investigación va de la mano de la asistencia, y que es lo mejor que podemos hacer en nuestro trabajo para ayudar a los pacientes. Gracias por confiar en mí para este proyecto tan especial, haberme guiado y haberme ayudado en mi desarrollo como profesional e investigadora.

A Gabriel, por tu inestimable ayuda con el análisis y procesamiento de las muestras, y por ayudarme a solventar todos los pequeños problemas que han ido surgiendo.

Gracias al personal de endoscopias y consultas de digestivo, que se ofrecieron a participar en el proyecto como voluntarios sanos en cuanto se lo propuse.

A mis amigas del colegio, Alba, Bea y Paula; y a mis médicos, Paula, David y Paula R. Gracias por haberme soportado durante los momentos bajos, y haber celebrado conmigo todos los pequeños logros, muchas veces incluso en la distancia. Soy muy afortunada por poder contar con gente como vosotros a mi lado.

A Diego, sin ti esto no hubiera sido posible. Eres el faro al que siempre busco durante la tormenta, y el puerto seguro donde poder resguardarme cuando lo he necesitado.

Y para finalizar, aunque no menos importante, quiero dar las gracias a toda mi familia por haberme apoyado todo este tiempo de una manera u otra. A mis padres y mi hermana, por escucharme y siempre tener las palabras adecuadas que me han dado el impulso y la confianza que necesitaba. Quiero hacer una mención especial a mis abuelos, siempre fuente de amor y alegrías, gracias porque me habéis regalado muchos de los mejores recuerdos de mi infancia. Y a mi abuelo Juan, decirte que me hubiera encantado haber compartido esto contigo. Sé que me hubieras estado preguntando todo el rato “¿qué tal va la tesis?”, con ese ojo medio guiñado que ponías cuando nos preguntabas por las notas. Sé que te la hubieras leído sin entenderlo mucho, y probablemente hubieras sacado hasta tus propias conclusiones y preguntas del tema. Y también sé que hubieras estado en primera fila el día de la defensa, el primero, para apoyarme.

Para ti, allá donde estés, y por todos vosotros.



## **SIGLAS Y ABREVIATURAS**

**AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos

**ANCA:** Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo

**ASCA:** Anticuerpos anti-*Saccharomyces Cerevisiae*

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

**CLR:** Receptor de la calcitonina-*like*

**COVID-19:** Infección aguda por SARS-COV-2

**CU:** Colitis ulcerosa

**EC:** Enfermedad de Crohn

**ECCO:** Sociedad europea de Crohn y colitis (*European Crohn's and colitis organization*)

**EII:** Enfermedad inflamatoria intestinal

**EII-NC:** Enfermedad inflamatoria intestinal no clasificada

**ELISA:** Enzimoimmunoanálisis de adsorción

**EPAN:** Neuronas extrínsecas primarias entéricas

**HUMV:** Hospital universitario Marqués de Valdecilla

**IHS:** Sociedad internacional de cefaleas (*International headache society*)

**ICHD-3:** Tercera edición de la Clasificación Internacional de Cefaleas

**IMIDs:** Enfermedades inmunomediadas

**IMC:** Índice de masa corporal

**IPAN:** Neuronas intrínsecas primarias entéricas

**MEIs:** Manifestaciones extraintestinales

**MC:** Migraña crónica

**MD:** Migraña definitiva

**MP:** Migraña probable

**PACAP:** *Pituitary adenylate cyclase activating peptide*

**RAMP1:** *Receptor modifying protein 1*

**RCP:** *Receptor component protein*

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNE:** Sistema nervioso entérico

**TAC:** Tomografía axial computarizada

**VIP:** Péptido intestinal vasoactivo

**5-ASA:** Aminosalicilatos

## **INDICE DE CONTENIDOS**

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Listado de tablas.....                                                                                            | 11 |
| Listado de figuras.....                                                                                           | 12 |
| 1. Resumen.....                                                                                                   | 14 |
| 2. Introducción.....                                                                                              | 20 |
| 2.1. Enfermedad inflamatoria intestinal.....                                                                      | 22 |
| 2.1.1. Epidemiología: Incidencia y prevalencia.....                                                               | 22 |
| 2.1.2. Fisiopatología.....                                                                                        | 23 |
| 2.1.3. Diagnóstico.....                                                                                           | 25 |
| 2.1.3.1. Síntomas.....                                                                                            | 25 |
| 2.1.3.2. Manifestaciones extraintestinales asociadas a EII o<br>enfermedades inmunomediadas asociadas a EII ..... | 26 |
| 2.1.3.3. Estudios de laboratorio.....                                                                             | 27 |
| 2.1.3.4. Hallazgos endoscópicos e histología.....                                                                 | 28 |
| 2.1.3.5. Estudios radiológicos.....                                                                               | 30 |
| 2.1.4. Clasificación e historia natural.....                                                                      | 30 |
| 2.2. Migraña.....                                                                                                 | 33 |
| 2.2.1. Clasificación y diagnóstico de las cefaleas primarias.....                                                 | 33 |
| 2.2.2. Migraña.....                                                                                               | 34 |
| 2.2.2.1. Prevalencia.....                                                                                         | 36 |
| 2.2.2.2. Diagnóstico.....                                                                                         | 37 |
| 2.2.2.3. Fisiopatología.....                                                                                      | 39 |
| 2.3. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.....                                                        | 41 |
| 2.3.1. Origen, subunidades, receptores.....                                                                       | 41 |
| 2.3.2. Funciones fisiológicas del CGRP.....                                                                       | 43 |
| 2.3.2.1. Funciones del CGRP en el tubo digestivo.....                                                             | 44 |
| 2.3.3. Fisiopatología del CGRP en la migraña.....                                                                 | 46 |
| 2.3.4. Dificultades para medición de CGRP.....                                                                    | 49 |
| 2.4. Relación entre migraña y EII .....                                                                           | 50 |
| 3. Planteamiento y objetivos.....                                                                                 | 53 |
| 3.1. Planteamiento.....                                                                                           | 56 |

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2. Objetivos.....                                                                     | 56  |
| 3.2.1. Objetivos principales.....                                                       | 56  |
| 3.2.2. Objetivos secundarios.....                                                       | 56  |
| 4. Hipótesis.....                                                                       | 58  |
| 5. Material y métodos.....                                                              | 62  |
| 5.1. Prevalencia de migraña en EII.....                                                 | 64  |
| 5.2. Alfa y beta CGRP en EII.....                                                       | 65  |
| 5.3. Beta-CGRP en COVID-19 con diarrea.....                                             | 67  |
| 5.4. Obtención y procesamiento de las muestras de alfa-CGRP y beta-CGRP.....            | 67  |
| 6. Publicaciones.....                                                                   | 70  |
| 6.1. Primera publicación.....                                                           | 72  |
| 6.2. Segunda publicación.....                                                           | 82  |
| 6.3. Tercera publicación.....                                                           | 94  |
| 6.4. Cuarta publicación.....                                                            | 106 |
| 7. Discusión global.....                                                                | 110 |
| 7.1. Prevalencia de migraña en EII.....                                                 | 112 |
| 7.2. Papel del alfa-CGRP y beta-CGRP en EII y beta-CGRP en COVID-19<br>con diarrea..... | 114 |
| 7.2.1. Alfa-CGRP en EII.....                                                            | 115 |
| 7.2.2. Beta-CGRP en EII.....                                                            | 118 |
| 7.2.3. Beta-CGRP en la infección por COVID-19 con diarrea.....                          | 123 |
| 7.3. Fortalezas y limitaciones.....                                                     | 123 |
| 8. Conclusiones.....                                                                    | 126 |
| 9. Bibliografía.....                                                                    | 129 |

## **LISTADO DE TABLAS**

**Tabla 1.** Descriptivo de algunos de los factores de riesgo/protectores para desarrollo de EII (adaptada del libro EII IV edición)

**Tabla 2.** Características endoscópicas de la EC y CU

**Tabla 3.** Clasificación de Montreal de distribución de CU

**Tabla 4.** Clasificación de Montreal de distribución de EC

**Tabla 5.** Clasificación de las cefaleas primarias según ICHD-3

**Tabla 6.** Preguntas incluidas en el cuestionario *ID-Migraine*

**Tabla 7.** Criterios diagnósticos de la migraña sin aura

**Tabla 8.** Criterios diagnósticos de la migraña con aura

**Tabla 9.** Criterios diagnósticos de MC

**Tabla 10.** Principales características de los anticuerpos monoclonales anti CGRP

**Tabla 11.** Principales resultados de estudios de prevalencia de migraña en EII

**Tabla 12.** Cuestionario específico usado en este estudio

**Tabla 13.** Datos clínicos y demográficos recogidos de historia clínica

## **LISTADO DE FIGURAS**

**Figura 1.** Fisiopatología de la EI

**Figura 2.** Fases clínicas de la crisis de migraña

**Figura 3.** Fisiopatología de la migraña

**Figura 4.** Estructura del receptor del CGRP

**Figura 5.** Localización y lugares de acción de las neuronas que liberan alfa-CGRP y beta-CGRP en el tubo digestivo

**Figura 6.** Esquematización de ELISA tipo sándwich

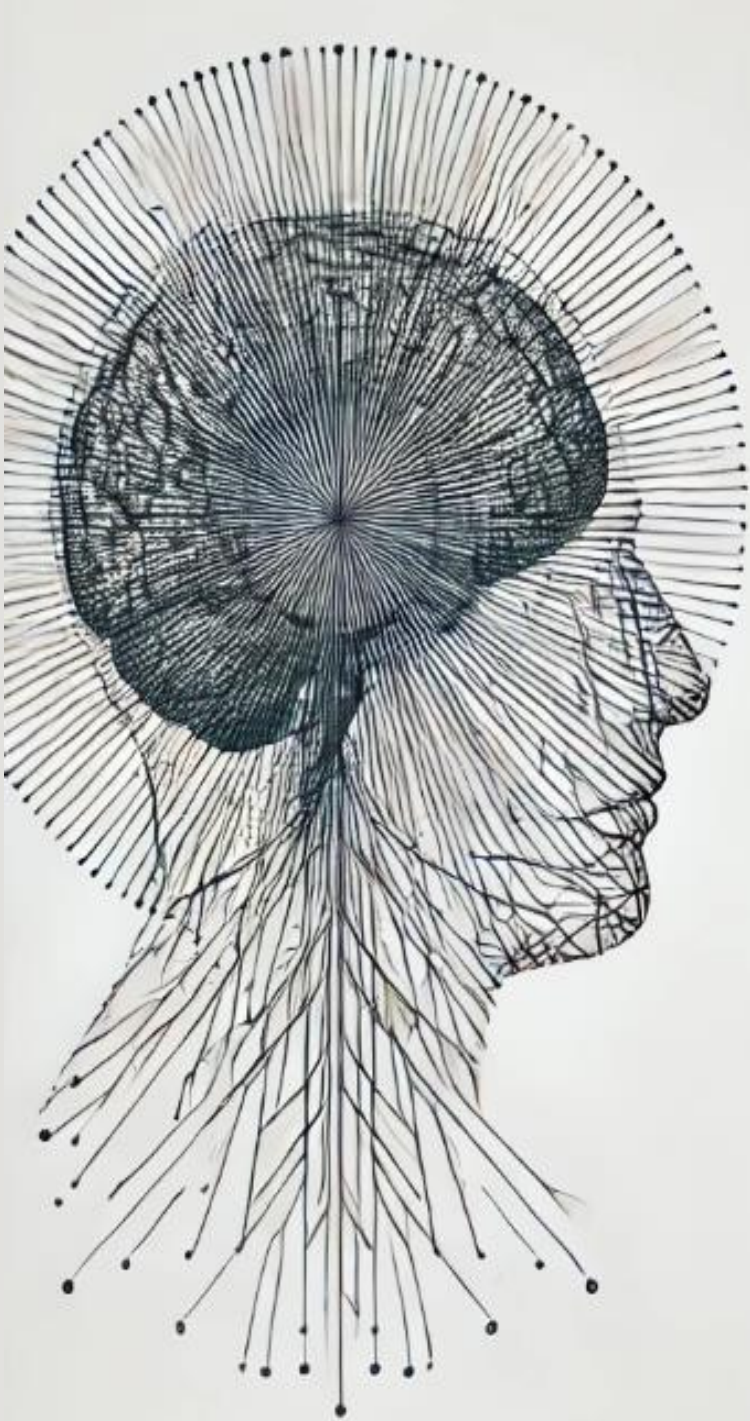
**Figura 7.** Funciones fisiológicas teóricas del alfa-CGRP en la pared intestinal

**Figura 8.** Funciones fisiológicas teóricas del beta-CGRP en la pared intestinal

**Figura 9.** Consecuencias teóricas del descenso de beta-CGRP en la pared intestinal



# 1.RESUMEN





## **ESPAÑOL**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende un grupo de enfermedades intestinales (principalmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) en las que, por mecanismos de origen multifactorial y en gran parte desconocidos, se produce una inflamación crónica del tracto digestivo. Afectan aproximadamente al 1% de la población, con un diagnóstico que se realiza por compendio de hallazgos clínicos, analíticos, endoscópicos, radiológicos e histológicos.

Por otro lado, la migraña es un subtipo de cefalea que afecta principalmente al sexo femenino, con una prevalencia global en torno al 12-15%. Su diagnóstico es clínico, y su cronificación (que ocurre aproximadamente en el 1-2% de la población mundial), es una de las causas más frecuentes de discapacidad y absentismo laboral en las mujeres de mediana edad. Aparte de síntomas neurológicos como la cefalea, la fotofobia, la sonofobia o el aura, también se producen síntomas digestivos como náuseas, vómitos o diarrea. En cuanto a su fisiopatología, a modo de resumen, se produce una activación del sistema trigémino-vascular, generándose una inflamación estéril y vasodilatación leptomeníngea secundarias a la liberación de neuropéptidos, lo que desencadena la cefalea típica de la crisis de migraña. En este sentido, se ha demostrado que existe una elevación significativa de uno de ellos, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), durante las crisis de migraña, y además de forma consistente y mantenida en la migraña crónica, postulándose como un biomarcador de esta enfermedad. Este descubrimiento ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos que bloquean el CGRP (anticuerpos monoclonales y los llamados gepantes), que son efectivos en el tratamiento de la migraña crónica y episódica.

El CGRP es un neuropéptido que tiene dos isoformas principales, el alfa-CGRP, liberado en el sistema nervioso central y en células inflamatorias, entre otras, y bastante ubicuo en el organismo (y la isoforma liberada en sistema trigémino vascular) y el beta-CGRP, exclusivamente liberado en el sistema nervioso entérico. La principal función del CGRP en el organismo es la vasodilatación local, migración de células inflamatorias y fenómenos de inmunidad. Llamativamente, la infusión exógena de este neuropéptido genera síntomas neurológicos como cefalea tipo migrañosa y síntomas digestivos como diarrea, náuseas o vómitos, mientras que el bloqueo del CGRP inducido por los nuevos tratamientos de la migraña, produce como principal efecto secundario el estreñimiento, lo que sugiere que este péptido tiene un papel importante en el tubo digestivo. Así como el alfa-CGRP ha sido bastante estudiado en la migraña, apenas se ha investigado la función del beta-CGRP, aunque de los pocos estudios disponibles se puede extraer que participa en la lucha contra infecciones, cicatrización de úlceras, motilidad intestinal y nocicepción local.

En base a lo comentado previamente, nos planteamos que podía existir una correlación entre ambas enfermedades, y que el CGRP podría jugar un papel en ambas entidades.

Así como en otras enfermedades digestivas sí que existe correlación con la migraña, en el caso de la EII los estudios publicados de comorbilidad son contradictorios.

Por todo esto, establecimos como objetivos de esta tesis corroborar la correlación sospechada entre migraña y EII mediante un estudio de prevalencia, y estudiar los niveles ambas isoformas (alfa y beta-CGRP) en la EII. La pandemia de COVID-19 nos ofreció la oportunidad de estudiar también la implicación de beta-CGRP en una enfermedad sistémica inflamatoria aguda con síntomas digestivos, como es la infección por COVID-19 con diarrea.

Los resultados obtenidos del estudio de prevalencia de migraña en EII arrojaron un incremento significativo de la prevalencia de migraña en pacientes con EII comparado con la población general, principalmente a expensas de un incremento en el sexo femenino, sugiriendo una correlación entre ambas enfermedades por medio de factores asociados al sexo biológico.

En cuanto a las isoformas del alfa y beta CGRP, encontramos resultados dispares: mientras que el alfa-CGRP incrementa en pacientes con EII, el beta-CGRP disminuye de forma significativa, manteniéndose estos resultados en enfermedad de Crohn como en colitis ulcerosa. El I alfa-CGRP estaba elevado a niveles similares de pacientes con migraña crónica, si bien cuando estratificamos a los pacientes con diagnóstico de migraña y EII, estos niveles eran incluso más elevados que los pacientes con EII sin migraña. Estos datos indican que el alfa-CGRP no es un marcador exclusivo de la migraña y que para su valoración adecuada en migraña tenemos que tener en cuenta las comorbilidades asociadas.

Por otra parte, el descenso de los niveles de beta-CGRP en la EII se explicaría por sus funciones teóricas en estudios experimentales, en las que se postula como un péptido protector de la mucosa intestinal, eliminando toxinas y promoviendo la motilidad intestinal. Por el contrario, los niveles de beta-CGRP aumentaron selectivamente en pacientes con diarrea por COVID-19, lo que implica a este péptido en la fisiopatología de la diarrea aguda y muestra su papel camaleónico en el tubo digestivo.

En síntesis, nuestros resultados son un ejemplo más de la estrecha y compleja relación intestino-cerebro, en este caso mediada por ambas isoformas del CGRP.

## **ENGLISH**

Inflammatory bowel disease (IBD) encompasses a group of intestinal diseases (primarily Crohn's disease and ulcerative colitis) in which chronic inflammation of the digestive tract occurs due to multifactorial and largely unknown mechanisms. They affect approximately 1% of the population, with diagnosis made through a combination of clinical, analytical, endoscopic, radiological, and histological findings.

On the other hand, migraine is a subtype of headache that primarily affects females, with a global prevalence of around 12-15%. Its diagnosis is clinical, and its chronicity (which occurs in approximately 1-2% of the global population) is one of the most common causes of disability and absenteeism in middle-aged women. In addition to neurological symptoms such as headache, photophobia, phonophobia, or aura, digestive symptoms like nausea, vomiting, or diarrhea also occur. Regarding its pathophysiology, in summary, there is an activation of the trigeminovascular system, resulting in sterile inflammation and leptomeningeal vasodilation secondary to the release of neuropeptides, which triggers the characteristic headache of a migraine attack. In this context, a significant elevation of one of these neuropeptides, calcitonin gene-related peptide (CGRP), has been demonstrated during migraine attacks, and it is consistently and persistently elevated in chronic migraine, being proposed as a biomarker for this condition. This discovery has led to the development of new drugs that block CGRP (monoclonal antibodies and the so-called gepants), which are effective in treating both chronic and episodic migraines.

CGRP is a neuropeptide that has two main isoforms: alpha-CGRP, released in the central nervous system and in inflammatory cells, among others, and quite ubiquitous in the body (and released in the trigeminal vascular system), and beta-CGRP, which is exclusively released in the enteric nervous system. The main function of CGRP in the body is local vasodilation, migration of inflammatory cells, and immune phenomena. Notably, the exogenous infusion of this neuropeptide generates neurological symptoms such as migraine-like headache and digestive symptoms like diarrhea, nausea, or vomiting, while the CGRP blockade induced by new migraine treatments primarily produces constipation as a side effect, suggesting that this peptide plays an important role in the digestive tract. While alpha-CGRP has been extensively studied in relation to migraines, the function of beta-CGRP has been scarcely investigated. However, from the few available studies, it can be inferred that it participates in combating infections, ulcer healing, intestinal motility, and local nociception.

Based on the aforementioned points, we hypothesized that there could be a correlation between both diseases, and that CGRP might play a role in both entities. While other digestive diseases do show a correlation with migraines, published studies on comorbidity in the case of IBD are contradictory.

For all these reasons, we set as objectives for this thesis to corroborate the suspected correlation between migraine and IBD through a prevalence study, and to study the levels of both isoforms (alpha and beta-CGRP) in IBD. The COVID-19 pandemic provided us with the opportunity to also study the involvement of beta-CGRP in an acute systemic inflammatory disease with digestive symptoms, such as COVID-19 infection with diarrhea.

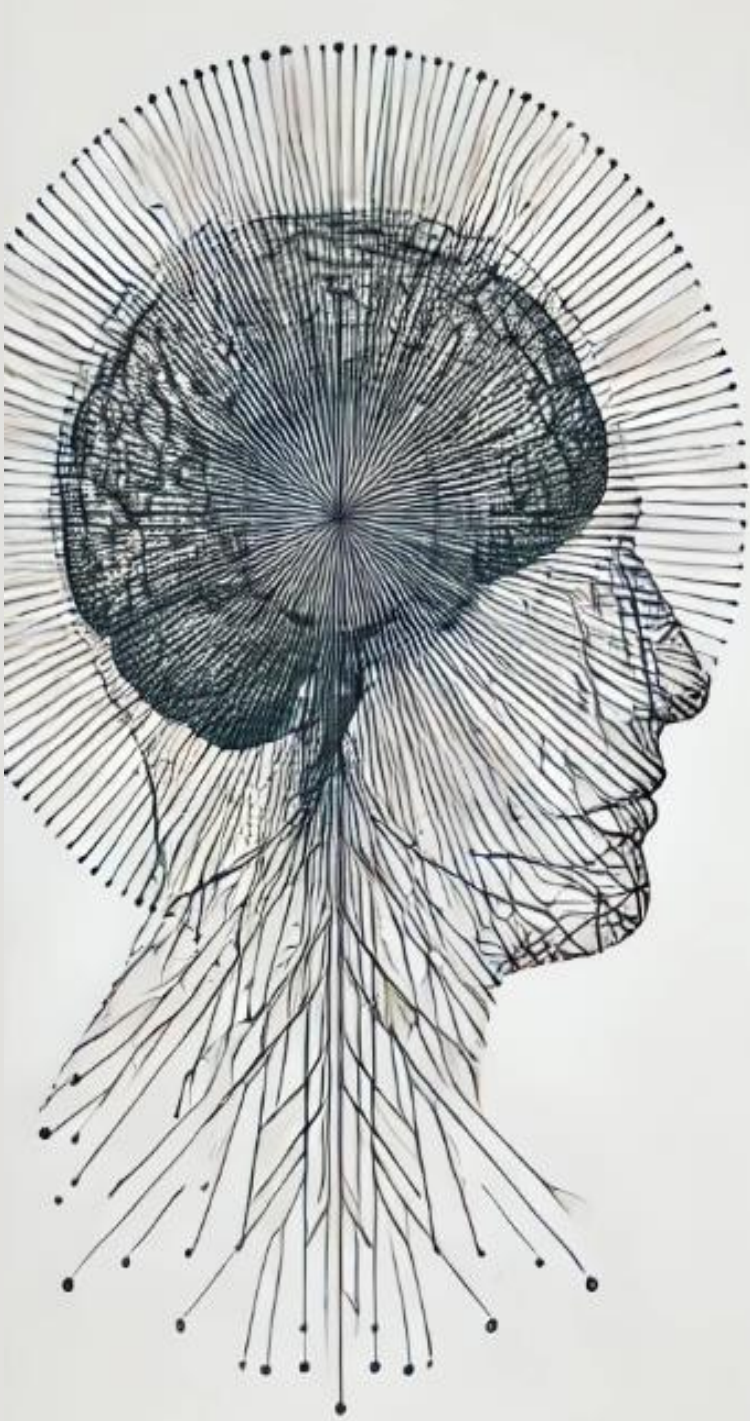
The results obtained from the prevalence study of migraine in IBD revealed a significant increase in the prevalence of migraine among IBD patients compared to the general population, primarily due to an increase in the female sex, suggesting a correlation between both diseases through factors associated with biological sex.

Regarding the isoforms alpha and beta CGRP, we found disparate results: while alpha-CGRP increased in IBD patients, beta-CGRP significantly decreased, with these results being consistent in both Crohn's disease and ulcerative colitis. Alpha-CGRP levels were elevated to levels similar to those of patients with chronic migraine, although when we stratified patients diagnosed with migraine and IBD, these levels were even higher than those in IBD patients without migraine. These data indicate that alpha-CGRP is not an exclusive marker for migraine and that for its proper evaluation in migraine, we must consider associated comorbidities.

On the other hand, the decrease in beta-CGRP levels in IBD could be explained by its theoretical functions in experimental studies, where it is posited as a protective peptide for the intestinal mucosa, eliminating toxins and promoting intestinal motility. Conversely, beta-CGRP levels increased selectively in patients with diarrhea due to COVID-19, implicating this peptide in the pathophysiology of acute diarrhea and demonstrating its chameleonic role in the digestive tract.

In summary, our results are yet another example of the close and complex gut-brain relationship, in this case mediated by both isoforms of CGRP.

## 2.INTRODUCCION





## **2.1 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) define a un grupo de enfermedades crónicas inflamatorias intestinales. Estas enfermedades, de forma general, son de origen multifactorial, y se producen como consecuencia de una activación de la respuesta inmune patológica frente a estímulos ambientales de microbiota intestinal sobre una predisposición genética del paciente. Esta inflamación genera un daño crónico de localización, intensidad y curso variables sobre cada individuo, lo que condicionará su pronóstico y necesidad de tratamientos crónicos<sup>1</sup>.

Los subtipos principales de EII son la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis no clasificada (EII-NC). Esta última hace referencia a la presencia de colitis que no presenta diagnóstico definitivo de EC o CU<sup>1</sup>.

### **2.1.1 EPIDEMIOLOGÍA: INCIDENCIA Y PREVALENCIA GLOBAL DE EII**

Existe un incremento tanto de la incidencia como de la prevalencia mundial de las EII en la segunda mitad del siglo XX<sup>2</sup>. En una revisión sistemática más reciente, en la que se incluyen 147 estudios poblacionales a nivel mundial y se recogen datos desde 1990 hasta 2016, se confirma una prevalencia estimada de más del 0,3% en países desarrollados (Europa, Norteamérica, Oceanía), donde la incidencia y la prevalencia global son mayores<sup>3</sup>. Por otro lado, se ha observado un incremento de incidencia en las últimas décadas a expensas de países en vías de desarrollo de Asia, Europa del este o Latinoamérica, aunque sin llegar a niveles de Occidente<sup>3-4</sup>.

La incidencia global de CU se sitúa entre 5-15 casos por 100.000 habitantes en la mayoría de los estudios poblacionales, pero existen áreas geográficas como Escandinavia donde se han comunicado incidencias de hasta 40 casos por 100.000 habitantes. La prevalencia de CU se estima en 400 casos por 100.000 habitantes en 2023<sup>5-7</sup>

En cuanto al caso de la EC, en países desarrollados se ha descrito una incidencia de entre 10,6 y 30 casos por 100.00 habitantes en países desarrollados (concretamente en Europa 10,6 casos por 100.000 habitantes) y una prevalencia en Europa de 322 casos por 100.000 habitantes<sup>3</sup>.

En el caso concreto de España, en el último estudio nacional publicado de incidencia de EII, se ha encontrado una incidencia de 16 casos por 100.000 habitantes de forma global, 7,5 para la EC, 8 para la CU y 0,5 para la EII-NC, respectivamente<sup>8</sup>.

### 2.1.2 FISIOPATOLOGÍA

La fisiopatología de la EII es compleja y multifactorial, como en muchas enfermedades autoinmunes. La unión de factores ambientales en un paciente genéticamente predispuesto es la que desencadena una respuesta inmune aberrante que genera inflamación intestinal<sup>1</sup>.

En cuanto a los factores genéticos predisponentes, el principal factor de riesgo para el desarrollo de una EII es la presencia de antecedentes familiares, con concordancias en gemelos homocigotos del 20-50% para EC y 15-20% para CU<sup>9</sup>. Adicionalmente, estudios genéticos de población con EII han identificado mutaciones que se asocian con la enfermedad, con cientos de *loci* implicados en la patogenia de esta enfermedad, que codifican proteínas que intervienen en la respuesta inmune, barrera intestinal, respuesta antimicrobiana, etc<sup>10-12</sup>. Se resumen los factores ambientales estudiados (protectores o predisponentes) con mayor evidencia para la EII en la tabla 1<sup>13-22</sup>.

| <b>Tabla 1. Descriptivo de algunos de los factores de riesgo/protectores para desarrollo de EII<sup>1</sup></b> |                  |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
|                                                                                                                 | <b>EC</b>        | <b>CU</b>        |
| <b>Tabaco</b>                                                                                                   |                  |                  |
| - Fumador                                                                                                       | Factor de riesgo | Factor protector |
| - Exfumador                                                                                                     | Factor de riesgo | Factor de riesgo |
| <b>Lactancia materna</b>                                                                                        | Factor protector | Factor protector |
| <b>Apendicectomía</b>                                                                                           | No influye       | Factor protector |
| <b>Anticonceptivos orales</b>                                                                                   | Factor de riesgo | Factor de riesgo |
| <b>Ambiente urbano</b>                                                                                          | Factor de riesgo | Factor de riesgo |

La microbiota intestinal es clave para la digestión de ciertos alimentos y compuestos químicos, y en la modulación y desarrollo del sistema inmune de todos los individuos. Su composición se va dando forma a lo largo de la vida: se hereda por vía materna, y se va modificando en función de factores ambientales e individuales<sup>23</sup>. La disbiosis, o

presencia de composición disfuncionante en la microbiota intestinal, se ha puesto de manifiesto en muchas enfermedades. En el caso de la EII, comparada con sujetos sanos, la microbiota tiene menos biodiversidad de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y un aumento de enterobacterias<sup>24</sup>.

El epitelio intestinal es la barrera natural entre el exterior (luz intestinal) y el interior del organismo, y nos sirve de protección contra microorganismos patogénicos. La alteración en esta barrera intestinal, con disminución de la barrera de moco protectora y el consiguiente aumento de presentación de antígenos por células dendríticas, induce una activación patológica del sistema inmune, con aumento de migración de linfocitos hacia la mucosa intestinal. Esto genera infiltrados de linfocitos con activación de las vías Th1 y Th17, y con ello la liberación de múltiples citoquinas que perpetúan esta respuesta inmune patológica, como TNF alfa, y otras como interferón  $\gamma$ , o interleucinas 1, 6, 12 o 23 y generan más inflamación, perpetuándose una respuesta inmune proinflamatoria (Figura 1)<sup>25-29</sup>.

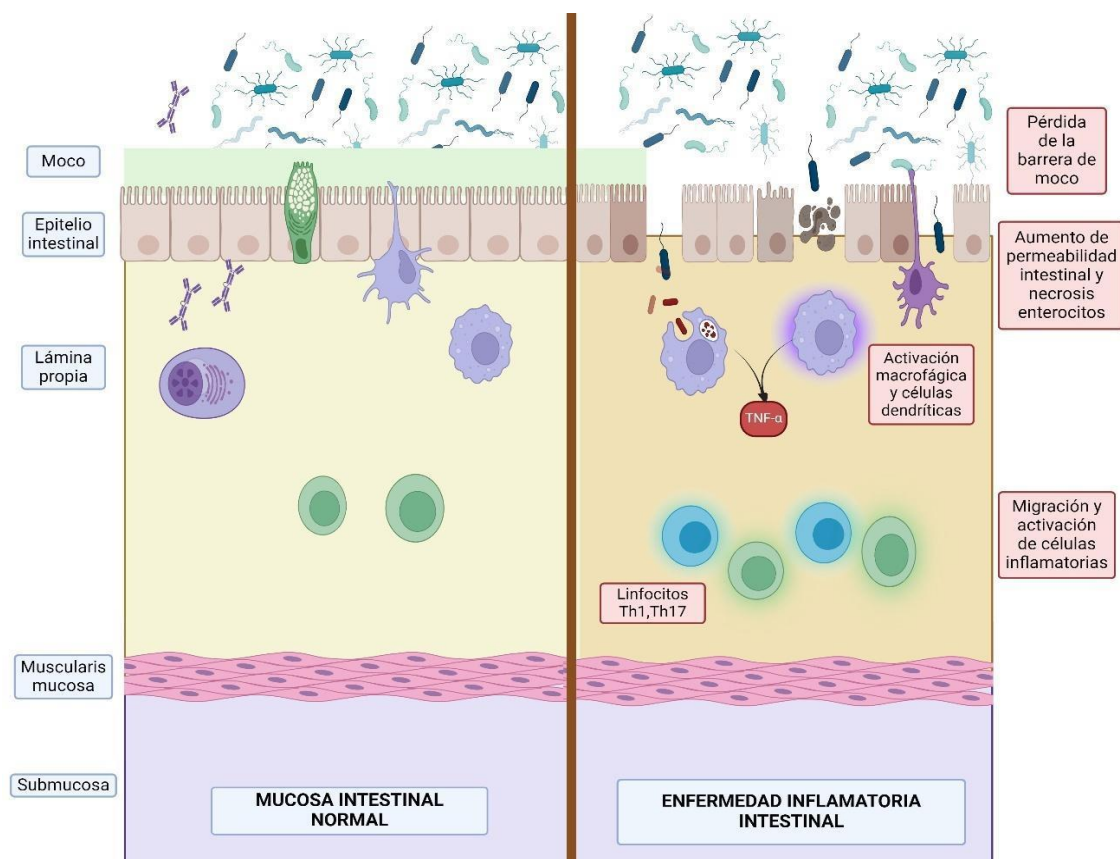


Figura 1. Fisiopatología de la EII. Figura de elaboración propia, creada con Biorender.com

### **2.1.3. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la EII se realiza mediante una combinación de hallazgos clínicos, analíticos, radiológicos y endoscópicos, sin presentar unos criterios definidos a diferencia de otras entidades. El consenso de criterios diagnósticos más utilizado en nuestro medio es la guía de la Sociedad europea de EC y CU (ECCO)<sup>30, 31</sup>.

#### **2.1.3.1 Síntomas**

Los síntomas de la EII son variables, y dependen del subtipo de enfermedad y de su localización. La presencia de diarrea de más de 4-6 semanas de duración y el dolor abdominal son los síntomas más frecuentes de la EII, aunque también son compartidos por muchas otras entidades, como por ejemplo el síndrome de intestino irritable. La aparición de sangre con la deposición o nocturnidad en las deposiciones puede ser un hallazgo clínico sugestivo. Síntomas generales como fiebre, pérdida de peso o manifestaciones extraintestinales como alteraciones dermatológicas, reumatológicas u oftalmológicas asociadas a EII también pueden formar parte del cuadro clínico general. No obstante, la EC y la CU presentan características clínicas que pueden ayudar a diferenciarse entre sí.

La clínica de la CU suele ser más homogénea entre pacientes, debido a la localización de la enfermedad. El síntoma más frecuente es el sangrado rectal y la diarrea crónica (>90% de los pacientes)<sup>32</sup>.

La rectorragia suele compartir características con el sangrado hemorroidal, en forma de sangre roja fresca al final de la deposición, aunque en el caso de la CU puede acompañarse de mucosidad<sup>33</sup>.

La afectación rectal de la enfermedad disminuye la distensibilidad rectal, y con esto el volumen de las deposiciones disminuye y su número se incrementa, pudiendo presentar síndrome rectal, con sintomatología que incluye pujos rectales, urgencia y tenesmo rectal, e incluso incontinencia fecal. La presencia de fístulas perianales debe hacer sospechar de EC<sup>32-35</sup>.

El dolor abdominal no se encuentra en casi un 40% de los pacientes, siendo menos frecuente que en la EC. El dolor puede ser difuso, hipogástrico, en fosa iliaca izquierda o centro abdominal<sup>32-34</sup>.

En caso de brotes graves de CU, lo que se conoce como colitis aguda grave, se pueden presentar síntomas sistémicos asociados como anorexia, vómitos, fiebre, pérdida de peso o desnutrición, entre otros<sup>34</sup>.

En la EC, los síntomas dependen de la localización de la enfermedad y el tipo de comportamiento, pudiendo además cambiar estos síntomas en el mismo paciente a lo largo de la evolución de la enfermedad<sup>29,36</sup>.

En líneas generales, la diarrea es el síntoma más frecuentemente referido por los pacientes con EC. En el caso de afectación de intestino delgado, será más abundante y habitualmente sin productos patológicos, mientras que en el caso de afectación de colon se puede asemejar a la CU y presentar rectorragia asociada e incluso síndrome rectal cuando afecta a esa zona<sup>36,37</sup>.

El dolor abdominal es el segundo síntoma más frecuente en la EC. Sus características son variables, aunque la localización más frecuente es en fosa iliaca derecha (dado que la afectación de íleon terminal y ciego es la más frecuente). En el caso de presencia de estenosis, el dolor puede ir acompañado de náuseas/vómitos, ruidos intestinales, distensión abdominal, aliviándose tras deposición y/o expulsión de gases<sup>36,37</sup>. Otros síntomas frecuentes de presentación son la pérdida de peso o la fiebre.

El 25% de los pacientes con EC presentan manifestaciones en la zona perianal, ya sea en forma de *skin tags*, úlceras, estenosis o fisuras, y más graves en forma de fístulas, con o sin abscesos perianales. La presencia de fístulas perianales complejas y recurrentes debe hacer sospechar EC<sup>38, 39</sup>.

#### **2.1.3.2 Manifestaciones extraintestinales (MEIs) y enfermedades inmunomediadas asociadas (IMIDs)**

Tanto la CU como la EC pueden presentar manifestaciones extraintestinales (MEIs) y enfermedades inmunomediadas (IMIDs), fruto de la afectación sistémica de estas

enfermedades. No obstante, la presencia de MEIs se asocia con más frecuencia a la EC<sup>40</sup>. Estos síntomas pueden preceder a la aparición de la EII y nos deben poner en alerta de su diagnóstico<sup>32,41</sup>. A modo de resumen, podemos encontrar:

- Manifestaciones reumatológicas: Espondiloartritis periférica, espondiloartritis axial, vasculitis.
- Manifestaciones dermatológicas: Eritema nodoso, pioderma gangrenoso, pioestomatitis vegetante, síndrome de Sweet, psoriasis, hidradenitis supurativa, vitíligo.
- Manifestaciones oftalmológicas: Uveítis, epiescleritis
- Manifestaciones hepatobiliares: Colangitis esclerosante primaria (en CU).

La presencia de IMIDs o MEIs asociadas a la EII habitualmente condiciona la necesidad de tratamientos más agresivos y/o selectivos para ambas entidades.

#### **2.1.3.3 Estudios de laboratorio**

La analítica puede poner de manifiesto la inflamación crónica característica de estas entidades. La presencia de trombocitosis, anemia, leucocitosis o elevación de reactantes inflamatorios (proteína C reactiva, velocidad de segmentación globular) son hallazgos inespecíficos pero sugestivos de inflamación crónica, aunque obligan a descartar causas infecciosas. La presencia de hipoalbuminemia o parámetros de desnutrición sugiere actividad grave de la enfermedad<sup>30,42</sup>.

Los marcadores serológicos, principalmente ANCA y ASCA, son inespecíficos y no deben, de forma aislada, ser diagnósticos de la enfermedad, aunque apoyan el diagnóstico en conjunción con otros hallazgos<sup>30; 42-44</sup>.

La calprotectina fecal, proteína presente en el citoplasma de neutrófilos, es un marcador con buena correlación con actividad endoscópica, aunque no específico, pues puede verse elevado en otras entidades, como con la toma de AINEs o inhibidores de la bomba de protones, dieta, actividad física o con procesos intercurrentes del tracto gastrointestinal (diverticulosis, infecciones o tumores gastrointestinales). Es un buen

marcador utilizado en el diagnóstico inicial con alto valor predictivo negativo; y durante la evolución para monitorización de actividad y respuesta a tratamiento<sup>30,45,46</sup>.

#### **2.1.3.4 Hallazgos endoscópicos e histología**

En un paciente con sospecha clínica o analítica de EI, la primera prueba a realizar es una ileocolonoscopia con toma de biopsias<sup>30,47</sup>. Esta prueba no solo permite confirmar el diagnóstico histológico de la enfermedad, sino valorar la extensión, el grado de actividad y la monitorización de respuesta al tratamiento<sup>47</sup>.

En la CU, los hallazgos sugestivos son la presencia de inflamación que se extiende desde margen anal de forma proximal de forma difusa y concéntrica, presentado típicamente una transición abrupta con el área sana. La mucosa presenta friabilidad, pérdida de patrón vascular y úlceras en casos más graves. Esta técnica permite valorar la extensión de la enfermedad en el caso de la CU, así como la actividad inflamatoria<sup>32</sup>.

En el caso de la EC, los hallazgos más habituales son la presencia de lesiones parcheadas en la mucosa intercaladas con áreas de mucosa preservada. Las úlceras suelen ser longitudinales, más profundas que en la CU, y ocasionalmente con aparición de fístulas o estenosis. La presencia de úlceras en el íleon también es un hallazgo sugestivo de EC<sup>36</sup>. Las principales diferencias endoscópicas entre ambas entidades se resumen en la tabla 2.

| Tabla 2. Características endoscópicas de la EC y CU <sup>30,36,47</sup> |            |                   |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|
|                                                                         | EC         | CU                |
| <b>Recto</b>                                                            | Respetado  | Afectado          |
| <b>Patrón vascular</b>                                                  | Normal     | Ausente           |
| <b>Patrón mucoso</b>                                                    | Nodular    | Granular          |
| <b>Friabilidad</b>                                                      | Escasa     | Llamativa         |
| <b>Distribución de las lesiones</b>                                     | Parcheada  | Continua y difusa |
| <b>Úlceras en colon</b>                                                 | Sí         | Sí                |
| <b>Empedrado</b>                                                        | Sí         | No                |
| <b>Haustración</b>                                                      | Pérdida    | Pérdida           |
| <b>Puentes mucosos</b>                                                  | Sí         | Sí                |
| <b>Pseudopólipos</b>                                                    | Sí         | Sí                |
| <b>Estenosis</b>                                                        | Frecuentes | Raras             |
| <b>Acortamiento luminal</b>                                             | Sí         | Sí                |
| <b>Úlceras ileales</b>                                                  | Sí         | No                |
| <b>Fístulas</b>                                                         | Sí         | No                |
| <b>Engrosamiento parietal</b>                                           | Sí         | No                |

El diagnóstico diferencial endoscópico de estas entidades suele ser con colitis infecciosas, colitis inducidas por fármacos, colitis de origen isquémico o colitis asociadas a divertículos, y en estos casos el diagnóstico histológico y el contexto clínico puede ayudar a diferenciarlas entre sí. Además, en ocasiones es difícil diferenciar la propia CU de la EC de afectación colónica, clasificándose estos pacientes como enfermedad inflamatoria intestinal no clasificable o indeterminada (EII-NC). Como apoyo a la EC colónica, la presencia de actividad parcheada, o tener mucosa rectal preservada.

En el caso de EC, se recomienda realizar un estudio completo de intestino delgado, ya sea mediante pruebas radiológicas (TAC o RMN) o endoscópicas (cápsula endoscópica). La cápsula endoscópica permite un estudio diagnóstico de intestino delgado en pacientes con alta sospecha de EC (elevación de reactantes y clínica sugestiva) e ileocolonoscopia normal, y como estudio de extensión de la afectación en pacientes con EC establecida, dado que la presencia de afectación proximal significa habitualmente mayor agresividad y puede condicionar el tratamiento. La presencia de al menos 3 úlceras en una cápsula endoscópica, previa retirada de AINEs durante el mes previo, es sugestiva de EC. Previo al procedimiento, se deberá valorar la posibilidad de estenosis significativa en intestino delgado, que contraindicaría la realización de esta prueba<sup>48-50</sup>.

Por último, la gastroscopia únicamente se encuentra indicada en pacientes con EC y síntomas de tracto digestivo superior, y no de forma rutinaria en pacientes asintomáticos adultos. Se realiza de forma rutinaria en EC de inicio en edad pediátrica <sup>30,51</sup>.

En cuanto a la histología, en el caso de la CU activa, los hallazgos histológicos más frecuentes son la distorsión de las criptas y la presencia de un infiltrado inflamatorio de predominio linfoplasmocitario, mucoso y difuso. La presencia de neutrófilos indica actividad de la enfermedad y suele asociarse a inflamación de criptas (criptitis) o luces glandulares (microabscesos crípticos), aunque también se encuentran en la lámina propia. Además, se pueden encontrar úlceras o erosiones de la mucosa y pólipos inflamatorios <sup>30, 52,53</sup>.

En el caso de la EC, a diferencia de la CU, la inflamación suele ser transmural, parcheada y heterogénea incluso en la misma región, con infiltrado linfoplasmocitario, y agregados linfocitarios submucosos, pudiendo aparecer criptitis. La aparición de granulomas histológicos es sugestiva de EC <sup>30,52-54</sup>.

#### **2.1.3.5 Estudios radiológicos**

Tanto la resonancia magnética (RM) como la tomografía axial computarizada (TAC) y la ecografía abdominal son técnicas válidas para el estudio de intestino delgado en EC, poniendo de manifiesto engrosamiento parietal con realce tras la administración de contraste, o la presencia de estenosis o fístulas<sup>55</sup>. La RM es la exploración habitualmente preferida en el diagnóstico, dada la ausencia de radiación ionizante <sup>30,56</sup>. Además, la ecografía intestinal en manos expertas puede tener un papel también en el diagnóstico o monitorización de la enfermedad <sup>57-58</sup>.

#### **2.1.4 CLASIFICACIÓN E HISTORIA NATURAL**

La clasificación de Montreal de 2005 se considera el estándar a utilizar para distribuir y estratificar los subtipos tanto de CU como de la EC <sup>59</sup>.

En el caso de la CU, la clasificación de Montreal estratifica a los pacientes según la máxima extensión de enfermedad vista mediante colonoscopia en tres subtipos: E1, enfermedad limitada al recto o rectosigmoidea; E2 o colitis izquierda, en el que las lesiones se extienden hasta ángulo esplénico; y E3 o colitis extensa, en el que la afectación va más allá de ángulo esplénico, pudiendo afectar de forma completa al colon (tabla 3).

| <b>Tabla 3. Clasificación de Montreal de distribución de CU</b> |                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                                                 | <b>Distribución de pacientes al diagnóstico</b> |
| <b>E1: proctitis o proctosigmoiditis</b>                        | 30-40%                                          |
| <b>E2: colitis izquierda</b>                                    | 30-35%                                          |
| <b>E3: colitis extensa o pancolitis</b>                         | 25%                                             |

En cuanto a la EC, la clasificación se divide en tres ítems (tabla 4): edad al diagnóstico (A); siendo A1 si el diagnóstico se realiza antes de los 16 años, A2 si es entre los 17 y los 40 años, y A3 más allá de los 40 años; localización de la enfermedad (L); clasificándose en ileal (L1), colon (L2), ileocolónica (L3) y tracto digestivo superior (L4); y el comportamiento de la enfermedad o *behaviour* (B) durante el curso evolutivo, con 3 subtipos: B1 inflamatorio o no estenosante-no penetrante; B2 estenosante o B3 penetrante (tabla). Adicionalmente, la aparición de enfermedad perianal (fístulas o abscesos perianales) durante la evolución de la enfermedad, se expresa añadiendo una “p” tras el comportamiento de la enfermedad, dado que es un factor modificador del curso clínico de la misma.

La localización más frecuente es la ileocecal (40%), íleon terminal (30%), seguida de colónica (15-30%). La presencia de afectación colónica suele asociarse con mayor frecuencia con aparición de enfermedad perianal.

| <b>Tabla 4. Clasificación de Montreal de distribución de EC</b> |                               |                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>Edad al diagnóstico (A)</b>                                  | <b>Localización (L)</b>       | <b>Comportamiento o fenotipo (B)</b>                                 |
| <b>A1: &lt; 16 años</b>                                         | L1: ileal                     | B1: inflamatorio o no estenosante-no penetrante                      |
| <b>A2: 17-40 años</b>                                           | L2: colon                     | B2: estenosante                                                      |
| <b>A3: &gt;40 años</b>                                          | L3: ileocolónica              | B3: penetrante                                                       |
|                                                                 | L4: tracto digestivo superior | Añadir “p” después del comportamiento en caso de enfermedad perianal |

En el curso evolutivo natural de la CU, la mayoría de los pacientes se mantienen en remisión clínica a lo largo del tiempo (hasta 50%), mientras que un 40% presentan actividad en forma de brotes intermitentes, y un 10% actividad crónica continua<sup>60, 61</sup>. Las tasas de colectomía en un metaanálisis de 15 estudios poblacionales que incluyeron más de 80.000 pacientes entre 2000 y 2015, fueron del 2,8% al año, 7 % a los 5 años y 9,6% a los 10 años del diagnóstico de la enfermedad<sup>62</sup>. A pesar de que la colectomía resuelve la enfermedad y consigue una buena calidad de vida en los pacientes, todavía hasta un 6% de los pacientes tienen complicaciones graves derivadas del reservorio ileoanal que requieren la reconversión a ileostomía<sup>63</sup>.

En el caso de la EC su curso evolutivo no es tan predecible como la CU. Mientras que la localización de la enfermedad suele mantenerse estable, durante su curso evolutivo su comportamiento se torna más agresivo: la mayoría de los pacientes tienen un fenotipo inflamatorio al diagnóstico, pero casi el 90% de los pacientes éste se modifica a lo largo del tiempo<sup>64, 65</sup>. Este dinamismo es lo que hace que los tratamientos para la EC tiendan a ser más agresivos, dado que cuando no ha habido complicaciones existen mayores tasas de remisión libre de esteroides, menos riesgo de cirugía y hospitalizaciones y por tanto mayor probabilidad de curación mucosa. El índice de Lémann es uno de los scores utilizados que combina los hallazgos en las pruebas complementarias endoscópicas, radiológicas y analíticas para intentar predecir el curso evolutivo de la EC <sup>66,67</sup>. La presencia de dos o más factores entre enfermedad perianal al diagnóstico, edad < 40 años al diagnóstico, localización ileocólica o necesidad de corticoides en el primer brote de la enfermedad se han asociado con peor pronóstico, lo que apoya el uso de inmunomoduladores y/o biológicos de forma temprana.

## **2.2MIGRAÑA**

Se define como cefalea a aquel dolor que ocurre entre la zona frontal y occipital de la cabeza. La cefalea constituye el síntoma doloroso recurrente más frecuente en la población, y una causa frecuente de consulta médica <sup>68, 69</sup>.

### **2.2.1 CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE CEFALIAS PRIMARIAS**

La cefalea se puede dividir en dos subtipos: primarias (sin causa reconocible) o secundarias (con causa reconocible). Para catalogar las cefaleas, se utiliza la *Clasificación de cefaleas, neuralgias y dolor facial* de la sociedad internacional de cefaleas (IHS), conocida como ICDH-3, donde un consenso de expertos internacionales clasificó con criterios diagnósticos casi 300 tipos de cefalea. Desde su primer consenso en 1988, nuevos criterios han sido añadidos y actualizados hasta su última versión en 2018 (ICHD-3), vigente hasta la fecha, en la que se incluyen cambios en la clasificación de algunas entidades, criterios diagnósticos y la inclusión de nuevos tipos de cefalea<sup>70, 71</sup>. Se resumen los subtipos de cefalea primaria en la tabla 5.

El objetivo de la clasificación es el diagnóstico de la cefalea fundamental del paciente, pudiendo coexistir varios tipos de cefalea en un paciente. En la casi totalidad de los casos, la cefalea se puede clasificar mediante una anamnesis detallada y una exploración neurológica y física, dejando las pruebas complementarias en un segundo plano en casos de duda diagnóstica<sup>72</sup>.

| Tabla 5. Clasificación de las cefaleas primarias según ICHD-3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Migraña</b><br>1.1. Migraña sin aura<br>1.2. Migraña con aura<br>1.3. Migraña crónica<br>1.4. Complicaciones de la migraña<br>1.5. Migraña probable<br>1.6. Síndromes episódicos que pueden asociarse a la migraña                                                                                                                                                                                     |
| <b>2. Cefalea de tipo tensional</b><br>2.1. Cefalea episódica infrecuente de tipo tensional<br>2.2. Cefalea episódica frecuente de tipo tensional<br>2.3. Cefalea crónica de tipo tensional<br>2.4. Cefalea de tipo tensional probable                                                                                                                                                                       |
| <b>3. Cefaleas trigémino-autonómicas</b><br>3.1. Cefalea en racimos<br>3.2. Hemicránea paroxística<br>3.3. Cefalea neuralgiforme unilateral de breve duración<br>3.4. Cefalea trigémino-autonómica probable                                                                                                                                                                                                  |
| <b>4. Otras cefaleas primarias</b><br>4.1. Cefalea tusígena primaria<br>4.2. Cefalea por esfuerzo físico primaria<br>4.3. Cefalea por actividad sexual primaria<br>4.4. Cefalea en trueno primaria<br>4.5. Cefalea por criostímulo<br>4.6. Cefalea por presión externa<br>4.7. Cefalea punzante primaria<br>4.8. Cefalea numular<br>4.9. Cefalea hipónica<br>4.10. Cefalea diaria persistente <i>de novo</i> |

### 2.2.2 MIGRAÑA

La migraña es un subtipo de cefalea primaria según la clasificación ICHD-3 y se subclasifica en migraña sin aura, migraña con aura y migraña crónica (MC). Adicionalmente, en esta clasificación se incluyen criterios diagnósticos de migraña probable (MP), complicaciones de la migraña y síndromes episódicos asociados a migraña<sup>71</sup>.

La migraña sin aura es un síndrome clínico establecido, en el que se incluye la presencia de cefalea de características específicas, además de otros síntomas asociados, entre los cuales juegan un papel relevante los gastrointestinales. La presencia de síntomas

neurológicos transitorios focales asociados a la migraña; ya sea antes o durante la misma, la clasifica como migraña con aura. Se cataloga la migraña como *crónica* cuando los días de cefalea superan los 15 al mes<sup>71</sup>. (Figura 2)

Muchos pacientes con migraña presentan síntomas premonitorios, que preceden a la crisis de cefalea. Los síntomas pueden ser variables, desde lentitud mental, fatiga, bostezos o dificultad de concentración, pasando por hiporexia, náuseas, aumento de apetito o incluso diarrea<sup>73</sup>. Los síntomas pueden aparecer incluso 3 días antes de la cefalea, y a veces permiten identificar al paciente su comienzo hasta 12 horas antes de que ocurra<sup>74</sup>.

El aura, en aquellos pacientes que la presentan (aproximadamente un tercio), acontece entre 5 y 60 minutos antes de la cefalea, aunque puede aparecer junto con la cefalea o continuarse después de aparecer ésta. Los síntomas más comunes son las alteraciones visuales, aunque también se pueden presentar como alteraciones sensoriales o disfasia<sup>75, 76</sup>.

La propia cefalea migrañosa también tiene características concretas: habitualmente es unilateral, pulsátil, de intensidad moderada-grave y con síntomas asociados como náuseas/vómitos y/o foto/sonofobia<sup>71</sup>.

Por último, una vez resuelta la cefalea, durante la fase de recuperación, los pacientes pueden describir síntomas posdrómicos hasta 48 horas después de la cefalea<sup>71</sup>, como astenia, somnolencia o dificultades cognitivas o de concentración, o cambios de humor<sup>77</sup>.

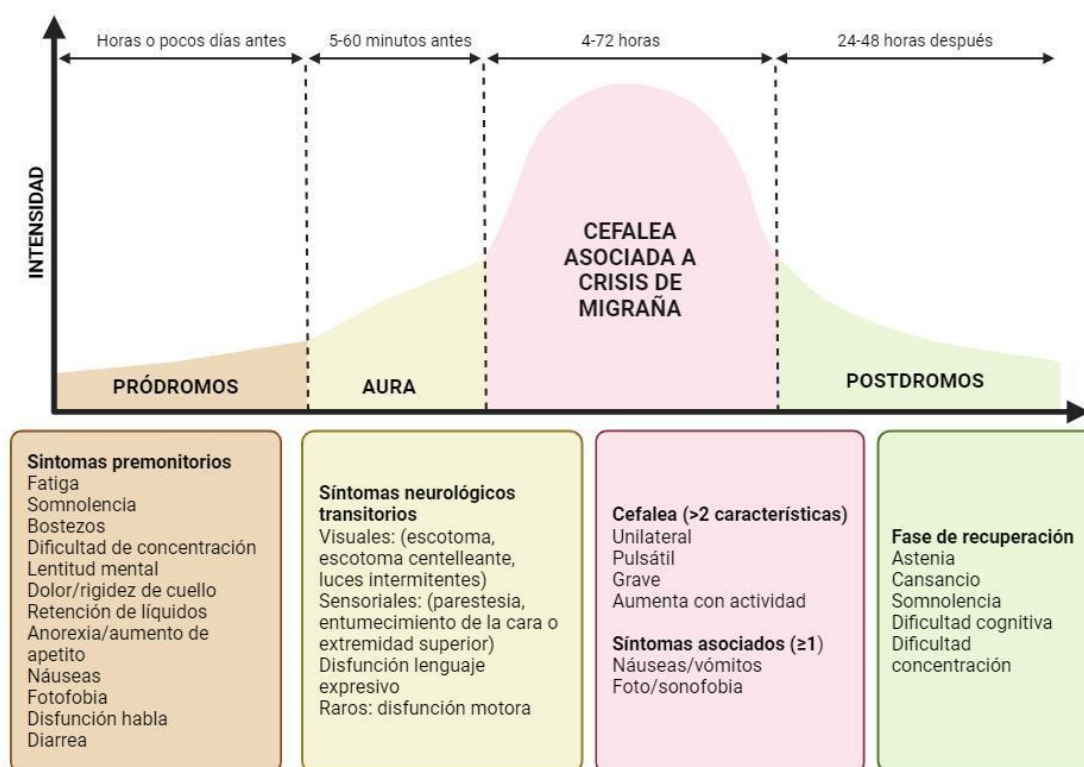


Figura 2. Fases clínicas de la crisis de migraña. Figura de elaboración propia con *Biorender*.

Las cefaleas y en concreto la migraña siguen liderando los rankings mundiales de causa de discapacidad, únicamente superada por la lumbalgia<sup>78</sup>. El hecho de que su mayor incidencia y prevalencia sea en el pico productivo de la población, la hace la tercera causa de discapacidad en personas menores de 50 años y muy especialmente en mujeres, con una incapacitación que va más allá del entorno laboral, ya que también afecta al entorno familiar y a la propia sociedad en su conjunto<sup>78-80</sup>.

### 2.2.2.1 Prevalencia

La prevalencia mundial de la migraña se encuentra en torno al 15% de los adultos, con una clara predominancia femenina (3:1). El pico de incidencia se encuentra entre los 25 y 34 años, y el de prevalencia entre los 35 y 39 años<sup>81-83</sup>.

Según ha demostrado un estudio reciente<sup>84</sup>, la migraña tiene una prevalencia en torno al 12,6% en nuestro país, siendo significativamente mayor en mujeres que en hombres (17,2% vs 8%). Aproximadamente dos tercios de los pacientes entrevistados cumplieron criterios de migraña estrictos o definitiva (MD), y un tercio de migraña probable (MP),

entendiendo por MP aquellos pacientes que cumplen todos los criterios diagnósticos menos uno. En el estudio, el 56% presentaban migraña sin aura, el 23,3% con aura, y el 20,6% restante, episodios de migraña con y sin aura. En el caso de MC, la prevalencia de esta afección se encuentra entre el 1-2% en población general<sup>85</sup>.

#### 2.2.2.2 Diagnóstico

El diagnóstico de migraña es principalmente clínico<sup>71</sup>. Existen cuestionarios validados para aproximar el diagnóstico de migraña en entornos no especializados, entre los cuales se encuentra el ID-Migraine<sup>86</sup>, en el que con unas preguntas sencillas se puede inferir el diagnóstico de migraña episódica (Tabla 6). La respuesta afirmativa a dos de los tres ítems sugiere la presencia de MP, mientras que si se responde de forma afirmativa a todos los ítems se clasifica como MD. Este cuestionario ha sido validado en lengua española, con una sensibilidad del 91%, especificidad del 73% y valor predictivo negativo del 93%, además de una buena reproducibilidad <sup>87</sup>.

| Tabla 6. Preguntas incluidas en el cuestionario <i>ID-Migraine</i> |                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Introducción                                                       | Durante los últimos 3 meses, ¿alguno de estos síntomas acompañó su dolor de cabeza?                                                       |
| Ítem 1                                                             | ¿Siente náuseas o malestar estomacal cuando tiene dolor de cabeza?                                                                        |
| Ítem 2                                                             | ¿La luz le molesta mucho más que cuando no tiene dolor de cabeza?                                                                         |
| Ítem 3                                                             | Su dolor de cabeza, ¿limita su capacidad de trabajar, estudiar o hacer cualquier actividad que necesite realizar durante al menos un día? |

Para el diagnóstico de migraña sin aura, se deben cumplir unos criterios diagnósticos establecidos en la ICHD-3, recogidos en la tabla 7 <sup>71</sup>. Para el diagnóstico definitivo de esta entidad, el paciente ha de presentar al menos cinco episodios con esas características y, en caso de no ser así, se clasificaría como caso probable.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabla 7. Criterios diagnósticos de la migraña sin aura</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>A. Al menos cinco crisis que cumplan los criterios B-D</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>B. Duración de las crisis de 4-72 horas</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>C. La cefalea tiene al menos dos de las siguientes características:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Localización unilateral</li> <li>2. Calidad pulsátil</li> <li>3. Intensidad moderada-grave</li> <li>4. Se agrava con las actividades físicas habituales o impide la realización de estas (por ejemplo, caminar o subir escaleras).</li> </ol> |
| <b>D. Al menos uno de los siguientes síntomas durante la cefalea:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Náuseas y/o vómitos</li> <li>2. Fotofobia y fonofobia</li> </ol>                                                                                                                                                                                   |
| <b>E. No se encuentran indicios en la historia clínica ni en el examen físico de que los síntomas puedan atribuirse a otra causa o sugieran más otro diagnóstico de la Clasificación Internacional de las Cefaleas</b>                                                                                                                                             |

El aura es un conjunto de síntomas neurológicos transitorios y focales, reversibles y que aparecen antes o durante la cefalea con las características referidas para la migraña sin aura. La mayoría de los síntomas son visuales (90%), seguidos de los sensitivos y de trastornos del lenguaje. Los síntomas suelen durar menos de 60 minutos. Los criterios diagnósticos de la ICHD-3 para el diagnóstico de migraña con aura se resumen en la tabla 8<sup>71</sup>

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabla 8. Criterios diagnósticos de la migraña con aura</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>A. Al menos dos crisis que cumplan los criterios B y C</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>B. Uno o más de los siguientes síntomas de aura completamente reversibles:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Visuales</li> <li>2. Sensitivos</li> <li>3. De habla o lenguaje</li> <li>4. Motores</li> <li>5. Tronco-encefálicos</li> <li>6. Retinianos</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>C. Al menos tres de las siguientes seis características:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Al menos un síntoma del aura se desarrolla gradualmente en 5 minutos o más y/o dos o más síntomas ocurren en sucesión</li> <li>2. Dos o más síntomas del aura aparecen sucesivamente</li> <li>3. Cada síntoma individual del aura dura entre 5 y 60 minutos</li> <li>4. Al menos un síntoma del aura es unilateral</li> <li>5. Al menos un síntoma del aura (visual o sensitiva) es positivo</li> <li>6. El aura es acompañada o seguida antes de 60 minutos por cefalea</li> </ol> |
| <b>D. Sin mejor explicación por otro diagnóstico y se ha descartado un accidente isquémico transitorio</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

En el caso de la migraña crónica, se define ésta como la presencia de cefalea en al menos los 3 meses previos al diagnóstico, con una frecuencia de 15 o más días al mes, y con al menos 8 episodios de todos ellos con características migrañosas, ya sean con o sin aura. Los criterios diagnósticos de la ICHD-3<sup>71</sup> se resumen en la tabla 9. Se calcula que la migraña episódica se cronifica anualmente en aproximadamente un 2,5% de los pacientes. Alrededor del 2% de la población cumple en nuestro medio criterios de migraña crónica. La prevalencia de la migraña crónica en mujeres de entre 40 y 50 años roza el 5% de la población<sup>85</sup>.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabla 9. Criterios diagnósticos de la migraña crónica</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>A. Cefalea (tipo tensional o migrañoso) durante un periodo de <math>\geq 15</math> días/mes durante <math>&gt; 3</math> meses que cumple los criterios B y C</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>B. Cursa en pacientes que han sufrido al menos cinco crisis que cumplen los criterios B-D para la migraña sin aura y/o los criterios B y C de migraña con aura</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>C. Durante un período de <math>\geq 8</math> días/mes por espacio de <math>&gt; 3</math> meses que cumple cualquiera de los siguientes:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. Los criterios C y D para la Migraña sin aura</b></li> <li><b>2. Los criterios B y C para la Migraña con aura</b></li> <li><b>3. En el momento de la aparición el paciente cree es migraña, y se alivia con un triptán o derivados ergóticos.</b></li> </ol> |
| <b>D. No atribuible a otro diagnóstico de la ICHD-3.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

### 2.2.2.3. Fisiopatología

La migraña es un trastorno neurovascular complejo, cuya fisiopatología no se conoce completamente hasta la fecha. Su circuito involucra múltiples estructuras del SNC, siendo las más importantes el hipotálamo, núcleos del tronco del encéfalo, el sistema trigémino vascular y la corteza cerebral<sup>88-90</sup>.

Durante la fase prodrómica y en el inicio del cuadro interviene principalmente el hipotálamo, que se encarga de la activación del resto de estructuras. El hipotálamo activa el tronco del encéfalo, entre ellos los núcleos del rafe y locus coeruleus, modulando la sensibilización al dolor y que a su vez activa el sistema trigémino-vascular. En algunos pacientes, se genera un fenómeno de depresión cortical propagada que es en realidad una onda de despolarización de propagación lenta de la membrana neuronal y la glía, que genera una hipoactivación de la actividad cortical, generalmente de origen

occipital hacia frontal, que es la que actualmente se considera la causante del inicio de la propagación del aura<sup>91</sup>.

El sistema trigémino-vascular es el principal motor en la génesis de la cefalea de tipo migrañosa. Es un circuito neuronal, cuya rama aferente son fibras nerviosas sensitivas que confluyen en el ganglio del nervio trigémino, transmitiendo la información a neuronas de segundo orden en el núcleo del trigémino, localizado en la unión del bulbo con la médula. Este núcleo también recibe inervación aferente del nervio occipital mayor. Su rama eferente, son las fibras parasimpáticas del nervio facial, que nacen en neuronas protuberanciales que hacen sinapsis en el ganglio esfenopalatino. La activación de este sistema desencadena la liberación de neuropéptidos a nivel de los vasos leptomeníngeos, que son estructuras muy sensibles al dolor que recubren al córtex cerebral. Estos péptidos algógenos son fundamentalmente el péptido en relación con el gen de la calcitonina (conocido por sus siglas en inglés de CGRP y que será el protagonista de esta tesis), liberado específicamente por el brazo aferente trigeminal) y el péptido intestinal vasoactivo y el polipéptido activador de la adenilato-ciclase de la pituitaria (VIP y PACAP), que son secretados por la porción parasimpática del nervio facial. Esto se traduce en una activación de mastocitos, aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y sensibilización de las terminaciones nerviosas, lo que genera una inflamación estéril y vasodilatación de los vasos leptomeníngeos, y con ello el dolor de cabeza<sup>91,92</sup>. Por tanto, podemos decir que el origen de la migraña es central, cerebral, mientras que el dolor propiamente dicho se debe a la inflamación y vasodilatación “periférica” leptomeníngea que condicionan péptidos algógenos.

De todos los péptidos liberados por el sistema trigémino-vascular, sin duda el CGRP es el más implicado en la fisiopatología del dolor (y otros síntomas) de la migraña. Las pruebas en este sentido son abrumadoras. Baste decir que 1) la infusión de CGRP induce cefalea que cumple los síntomas de migraña (y clínica digestiva en forma de diarrea aguda)<sup>93</sup>; 2) que los niveles de CGRP se encuentran elevados en diversos fluidos corporales en el seno de una crisis de migraña<sup>94-98</sup> e incluso de forma interictal en pacientes con migraña crónica<sup>99</sup>; y 3) que los modernos fármacos anti-CGRP son excelentes tratamientos frente a la migraña. Todos estos aspectos serán revisados en el siguiente apartado de esta tesis.

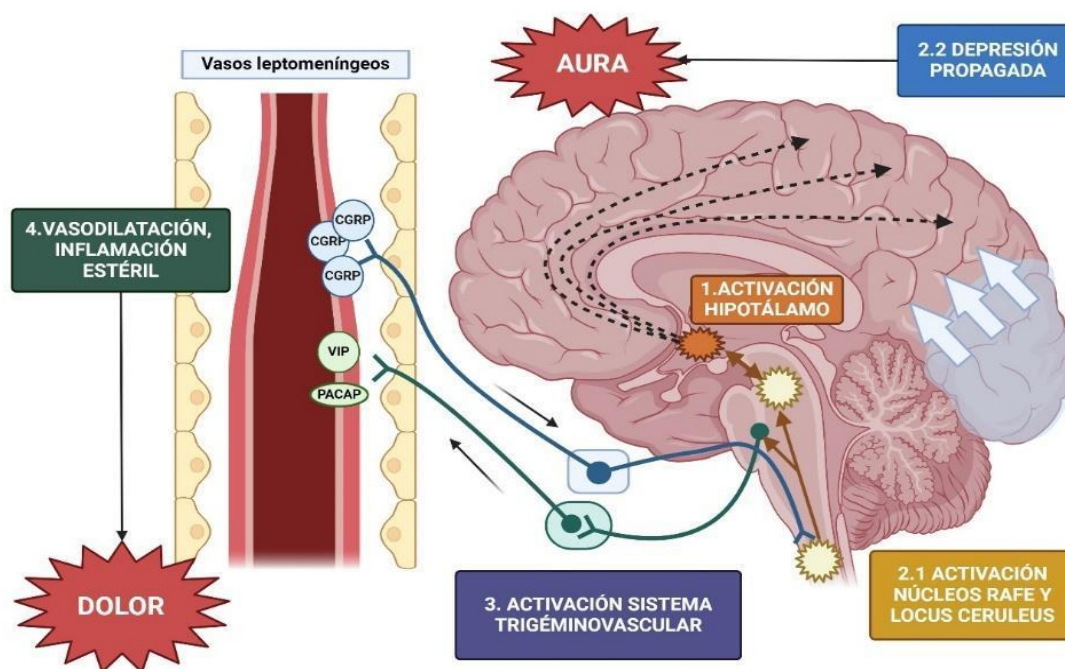


Figura 3. Fisiopatología de la migraña. Figura de elaboración propia creada con *Biorender.com*

## **2.3 PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP)**

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina o CGRP en sus siglas en inglés, es un neuropéptido de 37 aminoácidos de longitud, con dos isoformas principales, la isoforma alfa y la beta. Este péptido se expresa mayoritariamente en neuronas sensoriales, aunque también se encuentra en otros subtipos celulares, expresándose de forma ubicua en el cuerpo humano y participando en múltiples procesos patológicos como enfermedades digestivas<sup>100</sup>, pulmonares<sup>101</sup> o cardiovasculares<sup>102</sup>, aunque destaca en la migraña, dado que gracias a múltiples estudios se han conseguido desarrollar y comercializar moléculas anti-CGRP efectivas en tratamiento agudo y preventivo de la enfermedad<sup>103,104</sup>.

### **2.3.1. ORIGEN, SUBUNIDADES, RECEPTORES**

El CGRP se descubrió en 1982, a través del procesado alternativo del RNA mensajero del gen de la calcitonina (CALCA, cromosoma 11)<sup>105</sup> en varios subtipos celulares. Así, del mismo gen en las células de tiroides tipo C se sintetiza calcitonina, mientras que en las

células neuronales el producto final es el CGRP<sup>106</sup>. Este gen sintetiza la isoforma alfa del CGRP, mientras que la isoforma beta se sintetiza en otro gen (CALCB), también localizado en el cromosoma 11. Ambas isoformas difieren únicamente en 3 aminoácidos, pero comparten receptor, habitualmente tienen funciones superponibles<sup>107</sup>. La expresión de alfa-CGRP es mayor en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) mientras que beta-CGRP se expresa clásicamente en el sistema nervios entérico (SNE)<sup>108-110</sup>. Estos péptidos comparten una estructura común con calcitonina, amilina, adrenomedulina y adrenomedulina 2, formando la familia de péptidos de la calcitonina en los humanos<sup>107</sup>

El receptor del CGRP es complejo. Se compone de una estructura transmembrana acoplada a proteínas G de clase B, que se forma a partir de la unión del receptor de la calcitonina-like (CLR), la proteína accesoria transmembrana RAMP1 (*receptor modifying protein 1*), y la proteína accesoria *receptor component protein* (RCP) en su porción intracelular<sup>107</sup>. Para la unión del CGRP, CLR necesita la unión tanto de RAMP1 como de RCP para poder llevar a cabo sus funciones: RAMP1 transporta al CLR maduro a la membrana celular, mientras que RCP se une en su porción intracelular para poder activar la cascada intracelular por proteínas G<sup>111,112</sup> (Figura 4).

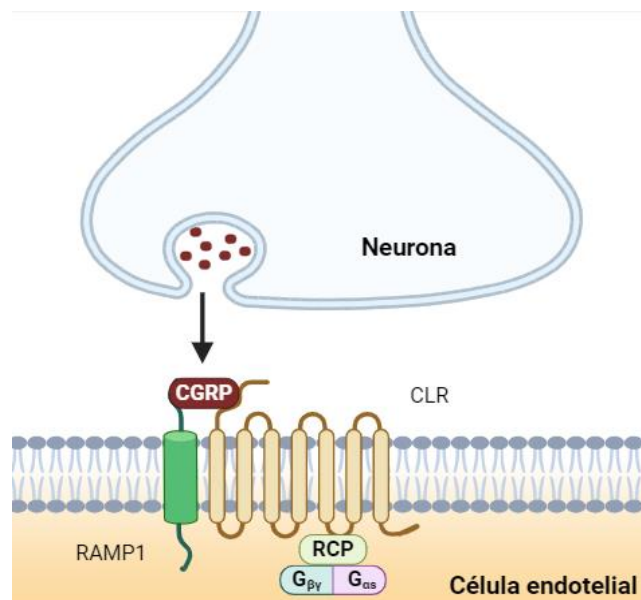


Figura 4. Estructura del receptor del CGRP. Figura de elaboración propia creada con Biorender.com

Las fibras nerviosas que contienen y liberan CGRP se distribuyen ampliamente a lo largo del organismo <sup>113,114</sup>, pero también su expresión se ha demostrado en otros tipos celulares como células del sistema inmune<sup>115-118</sup>, células endoteliales<sup>119</sup> queratinocitos<sup>120</sup> o adipocitos<sup>121</sup>, haciendo que sea una molécula ubicua en el organismo.

### **2.3.2 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL CGRP**

Ambas isoformas del CGRP tienen funciones similares, aunque con algunas diferencias, principalmente por su diferente localización. Como ya se ha comentado previamente, alfa-CGRP se libera principalmente en el sistema nervioso central, más concretamente en los ganglios espinales, ganglio de Gasser, sistema nervioso autónomo y neuronas sensitivas primarias<sup>108-110</sup>. Sin embargo, beta-CGRP se libera casi exclusivamente en un subtipo de neurona intrínseca primaria aferente del plexo mientérico de estómago, intestino delgado y colon <sup>122</sup>.

El principal efecto de la liberación del CGRP es la vasodilatación. Su potencia le convierte en el vasodilatador microvascular más potente del organismo, siendo 10 veces más potente que las prostaglandinas, y hasta 100 veces más que la sustancia P o la acetilcolina<sup>123</sup>. Tiene efectos sistémicos a nivel del sistema nervioso central, sistema cardiovascular o sistema renal<sup>124</sup>. El efecto vasodilatador se produce principalmente por un mecanismo independiente de óxido nítrico y del endotelio. Desde el punto de vista fisiológico, la administración exógena de CGRP produce reducción de la tensión arterial además de efectos ionotrópicos y cronotrópicos positivos<sup>125</sup>, aunque estudios con antagonistas de CGRP sugieren que no juega un papel primario en el control de tensión arterial o frecuencia cardíaca<sup>126</sup>. De forma local y desde el punto de vista fisiopatológico sí que se ha visto que juega un papel en enfermedades como el infarto de miocardio<sup>124</sup> o la isquemia<sup>1278</sup>, lo que sugiere que se libera de forma local en respuesta situaciones de estrés vascular como elemento de defensa.

La segunda función principal es la modulación de la inmunidad y de la inflamación. El CGRP se expresa, además de en neuronas, en células del sistema inmune<sup>115-118; 128</sup>. La contribución exacta en el sistema inmune no es del todo conocida, pero suele modular la respuesta inmune o bien promoviendo inflamación secundaria a vasodilatación, o

bien inhibiéndola mediante estimulación del AMPc. Dependiendo de en qué circunstancias se libere<sup>128,129</sup> o sobre qué tipo celular actúe<sup>130</sup> el propio CGRP puede ser antiinflamatorio o proinflamatorio. Como ejemplo, en las células de la duramadre de la meninge, el CGRP tiene efecto proinflamatorio generando degranulación de mastocitos que produce activación de macrófagos M1, clásicamente proinflamatorios<sup>131,132</sup>. Sin embargo y de forma opuesta, si estos macrófagos han sido expuestos a lipopolisacáridos, el CGRP tiene efecto antiinflamatorio activando macrófagos M2<sup>133</sup>.

En el SNC, donde se libera de forma ubicua, modula la sensibilización central como neuromodulador de actividad glutamatérgica, contribuyendo a los mecanismos de señalización del dolor<sup>113</sup>.

#### **2.3.2.1 Funciones del CGRP en el tubo digestivo**

En el tracto gastrointestinal, la liberación del CGRP es doble: por un lado, el alfa-CGRP, que proviene de neuronas sensoriales extrínsecas (EPAN) con origen en los ganglios espinales y que inervan todas las capas del tubo digestivo<sup>110</sup>; y por otro lado el beta-CGRP, que se libera exclusivamente en las neuronas primarias intrínsecas (IPAN) del SNE de los plexos mientéricos de la mucosa<sup>122</sup>. El receptor del CGRP en el tubo digestivo está presente en vasos sanguíneos, fibras musculares, mucosa, células endocrinas, células inmunes y por supuesto, neuronas<sup>11</sup>. Las funciones del CGRP en el tubo digestivo, en muchas ocasiones opuestas y contradictorias, se pueden resumir en regulación de la motilidad gastrointestinal, regulación de flujo sanguíneo local, y mantener la homeostasis en la mucosa<sup>134, 135</sup>.

Tanto las IPAN como las EPAN inervan de forma profusa las fibras musculares del tracto gastrointestinal. La liberación de CGRP facilita los movimientos peristálticos gastrointestinales<sup>134-136</sup>, aunque en el intestino delgado se han descrito efectos sobre la motilidad tanto estimuladores como inhibitorios<sup>137,138</sup>. Por ejemplo, la infusión endógena de CGRP en individuos sanos genera síntomas gastrointestinales que incluyen diarrea, náuseas o vómitos o urgencia defecatoria, y que no responden al uso de triptanes<sup>93</sup>, aunque sí parece responder a fármacos anti-CGRP como el olcegepante<sup>139</sup>.

En el caso de modelos de infecciones agudas como *Clostridium difficile*<sup>140</sup>, *Salmonella entérica*<sup>141</sup>, o afecciones alérgicas<sup>142</sup>, se ha demostrado una liberación aguda de CGRP como respuesta a la agresión de la mucosa intestinal, asociada a la presencia de diarrea e inflamación local. En esta línea, el bloqueo directo en modelos animales de las neuronas intestinales CGRP+ induce una reducción en la producción de moco por las células caliciformes, generando a su vez disbiosis intestinal<sup>143</sup>. Adicionalmente, en modelos animales de colitis inducidas por sustancias como el trinitrobenceno sulfónico o sal sódica de sulfato de dextrano, el CGRP se libera como medida protectora de la mucosa intestinal<sup>144-147</sup>.

En el tracto digestivo superior, el CGRP actúa regulando la secreción ácida gástrica y aumentando la vasodilatación local lo que facilita la cicatrización de úlceras gastrointestinales, aunque esta función es más atribuible a su isoforma beta<sup>148</sup>.

Como ya hemos visto, algunos linfocitos T segregan CGRP de forma independiente de las neuronas entéricas. Esta liberación contribuye a la regulación del sistema inmune local, inhibiendo la proliferación de linfocitos, inhibiendo la respuesta de linfocitos B a interleucina 7 a través de la interleucina 6 y factor de necrosis tumoral alfa, y así favoreciendo la homeostasis de la mucosa gastrointestinal. Estas funciones se sustentan en modelos experimentales de ratones CGRP-*null*, en los que se termina produciendo una colitis y una hiperplasia linfoide similar a una CU clásica<sup>149,150</sup>

Aunque los estudios experimentales focalizados en la isoforma beta-CGRP son escasos, un análisis global de la evidencia de la que disponemos hasta la fecha y que acabamos de repasar indicaría un posible rol protector en la mucosa intestinal de este neuropéptido (Figura 5).

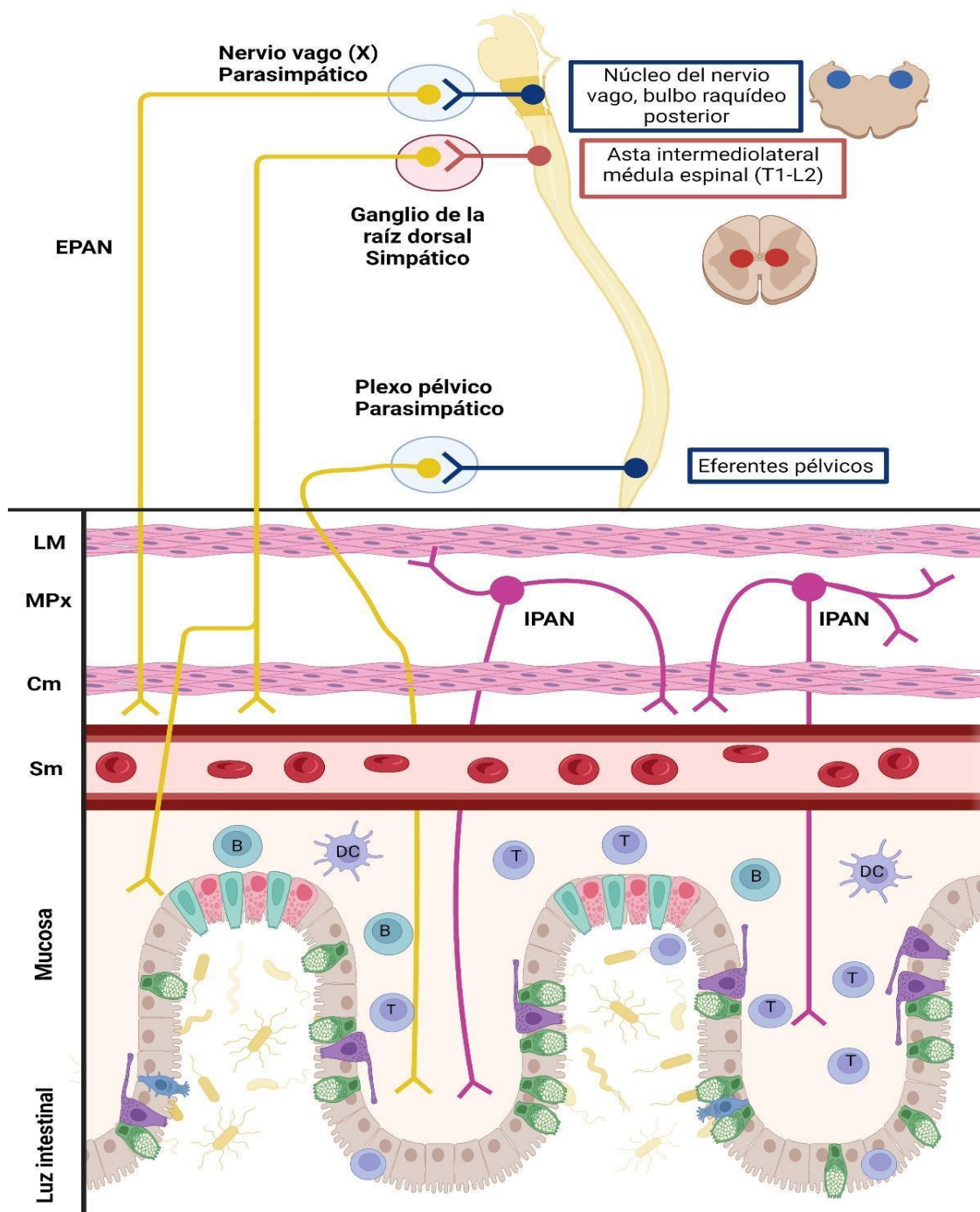


Figura 5. Localización y lugares de acción de las neuronas que liberan alfa-CGRP y beta-CGRP en el tubo digestivo. Figura de elaboración propia creada con *Biorender.com*

### 2.3.3 FISIOPATOLOGÍA DE CGRP EN LA MIGRAÑA

El papel más estudiado del CGRP resulta de su liberación excesiva en el sistema trigémino-vascular en la fisiopatología de la migraña. El CGRP es liberado por la rama

aferente del nervio trigémino, lo que genera vasodilatación local e inflamación estéril, como se comentó previamente.

Numerosos estudios han demostrado la contribución del CGRP a la fisiopatología de la migraña, con elevación aguda durante los ataques de migraña en la migraña episódica, pero también el incremento persistente y mantenido en pacientes con MC. Estos estudios en MC se han encontrado en múltiples fluidos como en sangre periférica<sup>195,99</sup> como en otros como saliva<sup>96</sup>, lágrimas<sup>97</sup> o líquido cefalorraquídeo<sup>98</sup>. Además, su disminución se correlaciona con la respuesta clínica al tratamiento con triptanes en la crisis de migraña inducida por la infusión de CGRP<sup>151</sup>, o toxina botulínica<sup>152, 153</sup> y anticuerpos monoclonales contra CGRP en pacientes con MC<sup>154,155</sup>.

A raíz de estos descubrimientos en la fisiopatología de la migraña de los últimos años, se han desarrollado y comercializado dos líneas de tratamiento para MC basados en el bloqueo del CGRP: los gepantes y los anticuerpos monoclonales contra el CGRP<sup>156,157</sup>.

Los gepantes son pequeñas moléculas no peptídicas antagonistas específicos de CGRP<sup>158</sup>. Su primer desarrollo a principios de siglo fue infructuoso por la biodisponibilidad baja vía oral y la toxicidad hepática que producían<sup>159</sup>. Los nuevos gepantes de última generación superaron las dificultades de los primeros gepantes, con presentaciones por vía oral. Los principios activos aprobados por la agencia europea del medicamento son el atogepante (Aquipta®, AbbVie) y rimegepante (Vydura®, Pfizer), mientras que en la FDA están aprobados también ubrogepante (Uberlvy®, Allergan) y avegepante (Zavzpret®, Pfizer). Estas moléculas han demostrado ser efectivas en el tratamiento de los ataques agudos de migraña sobre placebo, con reducción significativa de la cefalea y síntomas asociados en menos de 2 horas; escasos efectos secundarios (mareo, náuseas, estreñimiento o fatiga), y buen perfil de seguridad (tasa de efectos secundarios similar a placebo)<sup>160</sup>. Estos fármacos son efectivos además en pacientes refractarios a triptanes en episodios agudos de migraña<sup>161</sup>, familia de fármacos utilizada clásicamente para los ataques de migraña. Además, rimegepante se encuentra aprobado para tratamiento preventivo de migraña episódica<sup>162</sup>, y atogepante como tratamiento preventivo de migraña episódica y migraña crónica<sup>163</sup>.

La otra familia de fármacos contra el CGRP son los anticuerpos monoclonales, y éstos se comercializan como tratamiento preventivo en MC, MC refractaria o de migraña episódica de alta frecuencia. Los cuatro anticuerpos comercializados [erenumab (Aimovig®, Novartis), galcanezumab (Emgality®, Eli Lilly), fremanezumab (Ajovy®, Teva) y eptinezumab (Vyepty®, Lundbeck)], se pueden subdividir en dos subgrupos de fármacos: aquellos que bloquean el CGRP libre, y aquellos que bloquean el receptor del CGRP. Se resumen sus principales características en la tabla 10.

| <b>Tabla 10. Principales características de los anticuerpos monoclonales anti CGRP</b> |                    |                     |                     |                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
|                                                                                        | <b>Eptinezumab</b> | <b>Galcanezumab</b> | <b>Fremanezumab</b> | <b>Erenumab</b> |
| <b>Vida media</b>                                                                      | 31 días            | 28 días             | 40 días             | 21 días         |
| <b>Vía de administración</b>                                                           | Endovenosa         | Subcutánea          | Subcutánea          | Subcutánea      |
| <b>Diana</b>                                                                           | CGRP libre         | CGRP libre          | CGRP libre          | Receptor CGRP   |
| <b>Tipo de anticuerpo</b>                                                              | Humanizado         | Humanizado          | Humanizado          | Humano          |

Los anticuerpos monoclonales reducen los días de cefalea mensuales de forma efectiva en pacientes con MC o migraña episódica de alta frecuencia, incluso refractaria a otros tratamientos, con reducción de consumo de analgésicos, además de mejoría de la calidad de vida y disminución de la discapacidad asociada a la migraña<sup>164,165</sup>.

A todo esto, se añade que los anticuerpos monoclonales son fármacos muy seguros y bien tolerados. Ninguno de los anticuerpos ha demostrado tener efectos secundarios a nivel cardiovascular<sup>166</sup>. Sus principales efectos secundarios son enrojecimiento local en el sitio de inyección y efectos gastrointestinales, destacando entre ellos la aparición de estreñimiento<sup>167</sup>. Erenumab es el que produce más estreñimiento, con porcentajes de hasta el 25% de los pacientes<sup>168</sup>. Este efecto secundario se explicaría por el bloqueo de su acción fisiológica en la motilidad gastrointestinal y es tentador relacionar este efecto secundario con su antagonismo sobre la isoforma beta<sup>168,169</sup>.

Se puede concluir que los nuevos tratamientos han supuesto una auténtica revolución en el tratamiento de la migraña y muy probablemente se convertirán en el tratamiento preventivo por excelencia<sup>170,171</sup>. Su estudio extensivo desde su aprobación ha incrementado con creces nuestro conocimiento sobre su manejo, pero existen todavía

cuestiones por resolver que pueden aportarnos una información muy valiosa y capaz de mejorar la calidad de vida de todas aquellas personas que sufren migraña.

#### **2.3.4 DIFICULTADES PARA LA MEDICIÓN DE CGRP**

La mayor dificultad para realizar estudios es la medición del péptido en la muestra obtenida dados sus problemas de preservación. El CGRP tiene una vida media teórica muy corta, de menos de 10 minutos. En ese sentido, los estudios previos no especificaban el procesamiento, almacenamiento o análisis de las muestras, lo que lógicamente explicaría la heterogeneidad de los estudios publicados.

En una tesis paralela a este trabajo<sup>172</sup>, nuestro grupo ha demostrado que el procesamiento inmediato a 4°C previo a su congelación a -80°C consiguió mantener estables las concentraciones de alfa y beta-CGRP durante 24 horas, lo que da consistencia a los resultados. Además, como paso previo a este trabajo, hemos llevado a cabo un exhaustivo análisis de nuestra seroteca (400 muestras) para homogeneizar y estandarizar los procedimientos de determinación del CGRP en futuros estudios<sup>173</sup>. Resumimos aquí nuestras principales conclusiones:

- En cuanto a la preservación, encontramos que a partir de los 6 meses de almacenamiento en cámaras de ultracongelación el CGRP se comienza a degradar y puede afectar a sus concentraciones de forma significativa.
- La técnica de análisis y los niveles obtenidos dependían del kit de ELISA utilizado, pudiendo generar conclusiones diferentes con las mismas muestras. Ensayamos 4 kits diferentes con nuestras muestras, encontrando varios con problemas de reproducibilidad y consistencia en varios de ellos. Tras los análisis, concluimos que los kits de Abbexa, Reino Unido, referencia: abx257902 y CUSABIO, República Popular de China, referencia: CSB-E08210h son los más adecuados para medir alfa-CGRP y beta-CGRP, respectivamente.
- Por último, se analizaron factores que pueden alterar los niveles de forma fisiológica, como la edad, el sexo o el ejercicio físico previo a la extracción. No se encontraron diferencias en la realización de ejercicio moderado previo a

extracción. En cuanto a la edad y el sexo, el beta-CGRP aumenta con la edad, y los niveles de alfa-CGRP son algo mayores en hombres con respecto a mujeres.

Por tanto, los estudios ya publicados por nuestro grupo, necesarios antes de poder emprender este proyecto de Tesis, han permitido sentar las bases de las condiciones necesarias para una medición razonablemente fiable de ambas isoformas del CGRP.

## **2.4 RELACIÓN ENTRE MIGRAÑA Y EII**

Los estudios que intentan buscar una correlación entre migraña y EII arrojan conclusiones discordantes, muy probablemente asociado al origen diferente de sus datos. En este sentido, tenemos diversos argumentos que apoyan la existencia de una asociación entre ambas.

Varios trabajos han indicado que existe una comunicación compleja entre la microbiota intestinal, el intestino y el sistema nervioso central, conocido como el eje microbiota-intestino-cerebro, donde el funcionamiento de una estructura está influenciado por el funcionamiento de la otra de forma bidireccional, incluyendo funciones como la regulación de inflamación, respuesta inmune o nocicepción<sup>174</sup>. De hecho, existe una asociación comórbida entre la migraña y varias enfermedades digestivas, como la enfermedad celiaca o el síndrome de intestino irritable, aunque los mecanismos fisiopatológicos de su asociación no se han estudiado en profundidad todavía <sup>175</sup>

En el caso de la posible asociación de la migraña con EII, los estudios publicados presentan resultados heterogéneos, debido principalmente a importantes sesgos metodológicos, como son el uso de bases de datos de aseguradoras sin confirmación diagnóstica, o los bajos números de personas incluidas (ver tabla 13). De varios estudios que intentan valorar esta asociación, cuatro no encontraron asociación (aunque provienen de datos de aseguradora) <sup>176-179</sup>, y de los otros siete que encontraron diferencias numéricas <sup>180-186</sup>, sólo fueron significativas en tres de ellos. En los tres con diferencias significativas, o bien incluían pocos pacientes <sup>182</sup>, o bien los porcentajes de prevalencia de migraña eran demasiado elevados (41% para EII 21,3% para controles respectivamente) <sup>183</sup>, o el método de diagnóstico de migraña era una simple pregunta<sup>184</sup>. Por tanto, encontramos un primer obstáculo para nuestra investigación,

que es confirmar la asociación entre ambas enfermedades. En un reciente metaanálisis en el que se incluyeron 10 estudios, se encontró una prevalencia de migraña en EII del 19% (intervalo confianza 15-22%), superior a la esperada en la población general en estudios realizados en nuestro medio<sup>187</sup>.

**Tabla 11. Principales resultados de estudios de prevalencia de migraña en EII**

| Autor, año                    | Número de pacientes con EII | Diagnóstico de EII             | Diagnóstico de migraña     | Prevalencia de migraña, % | Prevalencia de migraña en controles, % |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| Ford et al, 2009              | 100                         | Consulta EII                   | ID-Migraine                | 30                        | No disponible                          |
| Dimitrova et al, 2013         | 111                         | Encuesta de salud consulta EII | ID-Migraine                | 14                        | 7 (S)                                  |
| Anadol Kelleci et al., 2016   | 51*                         | Consulta EII                   | Cuestionario basado en IHS | 17,6                      | 17,6 (NS)                              |
| Cheraghi et al., 2016         | 80                          | Consulta EII                   | Cuestionario basado en IHS | 21,3                      | 8,8 (S)                                |
| Moisset et al., 2017          | 203                         | Consulta EII                   | Cuestionario basado en IHS | 41                        | 21,3 (S)                               |
| Bähler et al., 2017           | 4791                        | Registros de aseguradoras      | Registros de aseguradoras  | 2,2                       | 1,1 (NS)                               |
| Welander et al., 2021         | 4041                        | Biobank Health Survey          | UK biobank                 | 2,9                       | 2,98(NS)                               |
| Leitão et al., 2021           | 155                         | Biobank UK, consulta EII       | Entrevista basada en IHS   | 34,2                      | 20,8 (NS)                              |
| Liu et al., 2021              | 862                         | US National Health Survey      | Pregunta única **          | 28,1                      | 15,2 (S)                               |
| Kim et al., 2022              | 1027                        | Registros de aseguradoras      | Cuestionario IHS           | 1,6                       | 1,1 (NS)                               |
| González-Martínez et al. 2023 | 66                          | Consulta EII                   | Cuestionario MS-Q***       | 34,2                      | 20,8 (NS)                              |

Resumen de los estudios encontrados en Pubmed que estudiaban la prevalencia de migraña en EII (términos de búsqueda: *Crohn's disease/inflammatory bowel diseases/ulcerative colitis AND migraine*<sup>176-165</sup>. \*Este estudio solo incluía pacientes con EC. \*\*Los pacientes sólo fueron preguntados si tenían “migraña o cefalea intensa”, \*\*\* cuestionario de despistaje de migraña.

(NS): resultados estadísticamente no significativos (S): resultados estadísticamente significativos.

Una prueba de que creemos que pueden estar asociadas, como ya hemos comentado previamente, es que la migraña es una enfermedad neurológica con síntomas digestivos, como las náuseas, vómitos o diarrea. El alfa CGRP, además de encontrarse elevado en crisis de migraña y en la MC, ha demostrado su capacidad de producir síntomas digestivos: la infusión exógena de este péptido desencadena cefalea tipo migrañosa y aparición de diarrea, vómitos o malestar abdominal<sup>93</sup>. Además, al bloquear el CGRP con los nuevos tratamientos contra la migraña se produce como efecto secundario no deseado estreñimiento, lo que confirma que el CGRP media en la génesis de los síntomas digestivos en la enfermedad.

De forma paralela, en la EII, la inflamación crónica producida en el tubo digestivo también afecta al sistema nervioso. Estudios retrospectivos presentan una prevalencia de síntomas neurológicos variables en pacientes con EII de hasta el 3% en series retrospectivas<sup>188</sup>. Los cambios en el sistema nervioso entérico, la malabsorción producida por la enfermedad, el incremento de la respuesta inflamatoria sistémica, o el incremento de factores protrombóticos son algunas de las múltiples causas que pueden asociarse con estos síntomas, si bien sus mecanismos fisiopatológicos concretos en muchos casos se desconocen<sup>189</sup>.

Siguiendo con este argumento, el sistema nervioso entérico tiene su propia y exclusiva forma de CGRP, la beta-CGRP. Las funciones teóricas de esta molécula, comentadas previamente como la motilidad intestinal, regulación del flujo entérico, cicatrización de úlceras o lucha contra infecciones de patógenos, se extraen de estudios pequeños de laboratorio y en animales, pero no se han estudiado en humanos previamente.

Una oportunidad que nos surgió de demostrar alguna de sus funciones fisiológicas en el ser humano, como es la respuesta a infección contra patógenos intestinal del CGRP-beta, vino dada por la pandemia de COVID-19. La infección por SARS-COV-2, principalmente con clínica respiratoria, presenta también síntomas como cefalea de corte migrañoso (el síntoma neurológico más frecuente), o diarrea, que también es su síntoma digestivo más frecuente junto con náuseas, vómitos o hiporexia<sup>190</sup>. De hecho,

los síntomas digestivos aparecen hasta en un 20% de los pacientes con infección por SARS-COV-2<sup>191</sup>. Aunque la fisiopatología de la diarrea no se ha estudiado, sabemos que el punto de entrada del SARS-COV-2 es la enzima convertidora de angiotensina 2, presente tanto en células respiratorias como a lo largo del tubo digestivo. De hecho, se ha demostrado la presencia del virus en el tubo digestivo<sup>192</sup>. En la infección sistémica se produce una tormenta de citoquinas desencadenada por la rotura de la barrera epitelial, con liberación de IL-6, TNF-alfa, entre otros, y por tanto compartiendo ciertos mecanismos y mediadores (salvando las claras diferencias) con la EII <sup>193</sup>. En un estudio de nuestro grupo ya demostramos una elevación tanto de alfa-CGRP como de beta-CGRP en pacientes con infección por COVID-19<sup>194</sup>, y más allá demostramos la asociación sintomática de la cefalea durante la infección por COVID-19 con niveles más elevados específicamente del alfa-CGRP<sup>195</sup>. Faltaría analizar, por tanto, una posible asociación entre la presencia de diarrea y la liberación de beta-CGRP, como argumento final de que el CGRP está implicado en la fisiopatología de la diarrea en esta enfermedad.

### 3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS





### **3.1 PLANTEAMIENTO**

Con los argumentos expuestos previamente, nos planteamos inicialmente estudiar la posible asociación comórbida entre la migraña y la EII aprovechando las sinergias entre los Servicios de Digestivo y Neurología de nuestro hospital, en una serie amplia de pacientes bien diagnosticados.

Resultados positivos en cuanto a la asociación comórbida MC-EII justificarían plenamente el estudio de un posible rol fisiopatológico del CGRP y sus isoformas, y sobre todo de la isoforma beta, en la EII como modelo de inflamación intestinal crónica.

Adicionalmente, en el transcurso del trabajo, la epidemia del SARS-COV-2 nos ofreció la oportunidad inesperada de estudiar si el CGRP y sus isoformas juegan un papel en la fisiopatología de la diarrea aguda de un modelo de infección gastrointestinal aguda como es el COVID-19 y cuya fisiopatología se desconoce.

### **3.2 OBJETIVOS**

#### **3.2.1 OBJETIVOS PRINCIPALES**

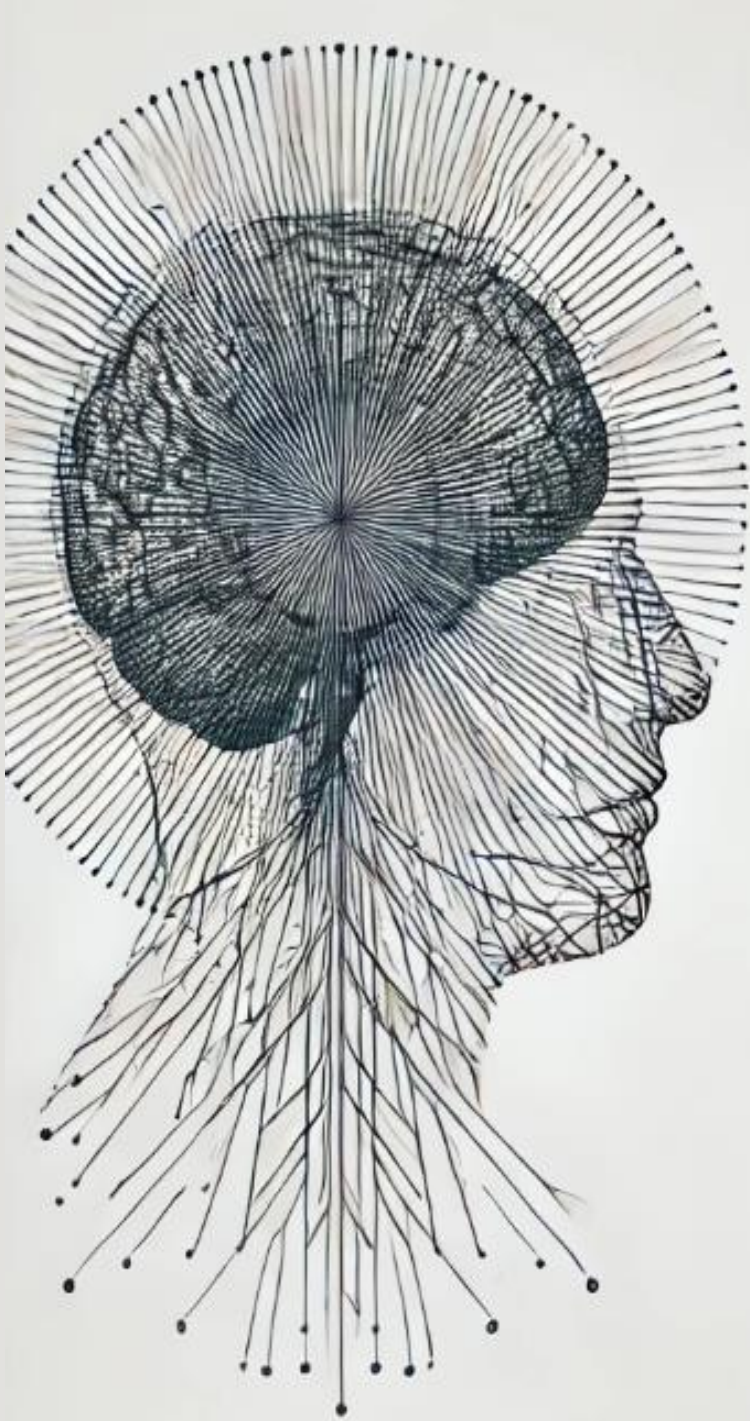
- Corroborar la correlación sospechada entre la migraña y la EII mediante un estudio de prevalencia de migraña en EII.
- Analizar los niveles de ambas isoformas del CGRP (alfa-CGRP y beta-CGRP) en pacientes con EII y su posible implicación en la fisiopatología de la EII.
- Examinar los niveles de la isoforma beta-CGRP en un modelo de infección aguda con afectación gastrointestinal, como es la infección por COVID-19 con diarrea

#### **3.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Establecer la influencia de un diagnóstico de migraña previo en los niveles de alfa-CGRP en pacientes con EII, para valorar su potencial como biomarcador específico en esta enfermedad.



## 4. HIPÓTESIS



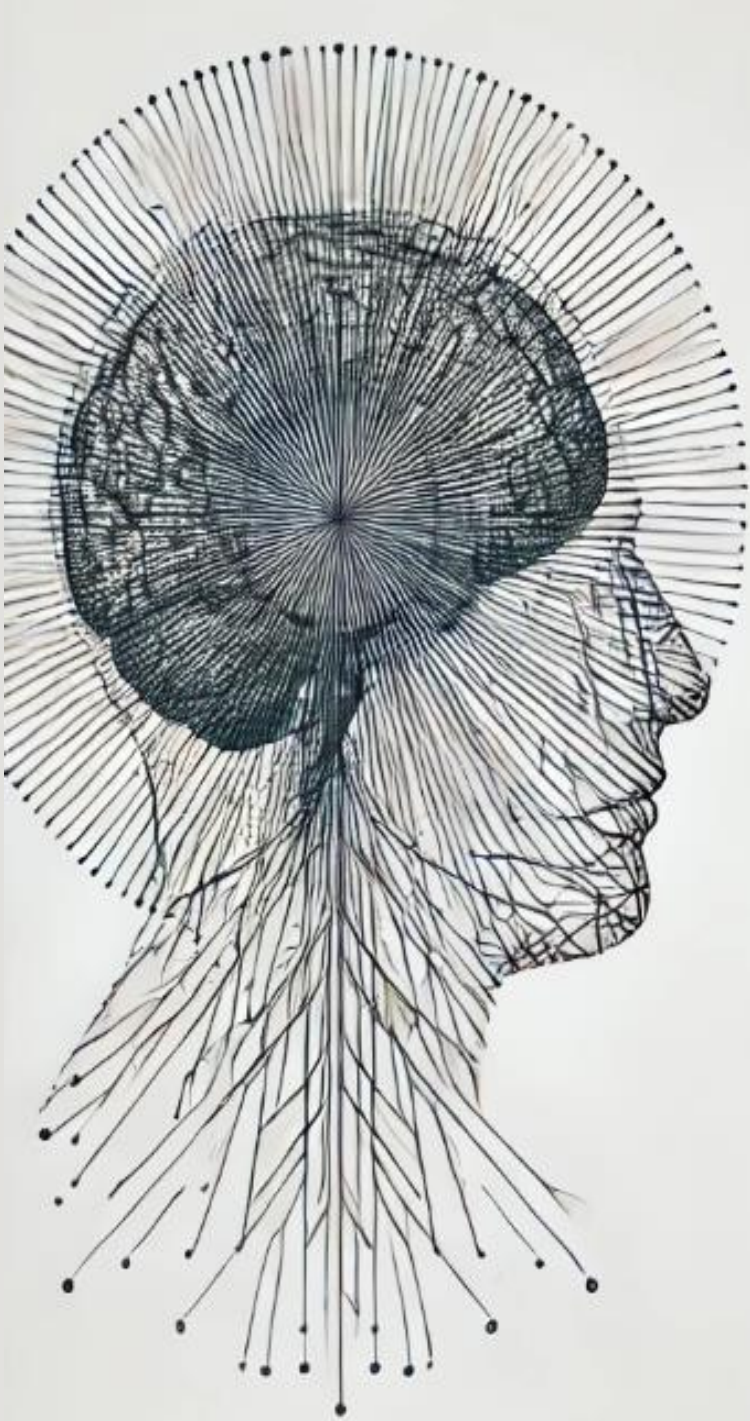


La hipótesis principal es que pudiera existir una relación comórbida entre EII y migraña y que es posible, teniendo en cuenta sus acciones fisiológicas, que ambas subunidades de CGRP (alfa y beta) se encuentren alteradas en pacientes con EII.

De forma paralela y teniendo en cuenta el papel hipotéticamente protector del beta-CGRP en la mucosa intestinal, nos planteamos que en pacientes con infección aguda; en este caso COVID-19 con afectación gastrointestinal, los síntomas digestivos puedan estar relacionados con la liberación de este neuropéptido.



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS





## 5.1 PREVALENCIA DE MIGRAÑA EN EII

Se diseñó un estudio transversal, que se realizó entre el 21 de noviembre de 2022 y el 22 de febrero de 2023, para estudiar la prevalencia de migraña en EII. Se recogieron pacientes con diagnóstico previo de EII entre 18 y 65 años en seguimiento en la unidad de EII del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Tras consentimiento informado, se entrevistó a los pacientes con un cuestionario específico (tabla 12), que incluía entre sus preguntas los ítems del *ID-Migraine*<sup>86-87</sup>. En caso de contestar “sí” a 3 preguntas del cuestionario *ID-Migraine* fueron clasificados como MD, y aquellos que contestaron “sí” a dos preguntas como MC. En los pacientes clasificados como migraña, ya fuera probable o definitiva, se recogieron el número medio de días con cefalea en los últimos 3 meses.

**Tabla 12. Cuestionario específico usado en este estudio\***

|    |                                                                                                                                                                                                  |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | En el último año, ¿Usted ha tenido dolor de cabeza no relacionada con traumatismo craneoencefálico, resaca o infecciones virales, como COVID-19 o la gripe?                                      |
| 2. | ¿Usted ha tenido dolor de cabeza en los últimos 3 meses?                                                                                                                                         |
| 3. | Si usted tuvo dolor de cabeza en los últimos tres meses, marque el número medio de días de dolor de cabeza:<br><input type="checkbox"/> <15 días al mes <input type="checkbox"/> ≥15 días al mes |
| 4. | ¿El dolor de cabeza ha limitado sus actividades durante al menos un día en los últimos 3 meses?                                                                                                  |
| 5. | ¿Usted tiene náuseas, vómitos o malestar gástrico cuando tiene dolor de cabeza?                                                                                                                  |
| 6. | ¿A usted le molesta la luz cuando tiene dolor de cabeza?                                                                                                                                         |
| 7. | ¿Alguna vez algún profesional sanitario le ha diagnosticado previamente de migraña?                                                                                                              |

\*Las preguntas 4-6 son el cuestionario de despistaje de *ID-Migraine*<sup>86-87</sup>

Tras finalizar el cuestionario de forma complementaria se revisaron y recogieron datos clínicos y demográficos pertinentes en su historia clínica, resumidos en la tabla 13.

| <b>Tabla 13. Datos clínicos y demográficos recogidos de historia clínica</b> |
|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sexo</b>                                                                  |
| <b>Edad</b>                                                                  |
| <b>Subtipo de EII</b>                                                        |
| <b>Años de evolución de EII</b>                                              |
| <b>Enfermedad perianal</b>                                                   |
| <b>Tratamiento inmunosupresor</b>                                            |
| <b>Tratamiento biológico</b>                                                 |
| <b>Cirugía previa asociada a EII</b>                                         |
| <b>Ingresos previos asociados a EII</b>                                      |
| <b>MEIs o IMIDs</b>                                                          |
| <b>Historia previa de migraña</b>                                            |

## **5.2 ALFA-CGRP Y BETA-CGRP EN EII**

Se reclutaron de forma consecutiva y prospectiva, entre diciembre de 2020 y marzo de 2023, pacientes con diagnóstico clínico de EII en el año previo a la extracción, y se compararon con controles sanos, sin diagnóstico de migraña ni de EII, y pacientes con MC. Se excluyeron:

- Pacientes menores de 18 años y mayores de 85 años.
- Diagnóstico de EII con más de 365 días de la fecha de inclusión en el estudio/extracción sanguínea.
- Pacientes con enfermedades psiquiátricas activas significativas, permitiéndose formas no graves de síndrome ansioso-depresivo o trastorno adaptativo.
- Pacientes con tratamiento activo o previo con inmunosupresores o biológicos por su EII. Se permitieron el uso de aminosalicilatos (5-ASA) tópicos u orales, y corticoides tópicos, orales o endovenosos.

El diagnóstico de EII se estableció según hallazgos clínicos, endoscópicos y radiológicos de acuerdo con los criterios ECCO, ya comentados en la introducción<sup>30</sup>. Se tomó la fecha de diagnóstico de la EII como la fecha de la confirmación endoscópica/histológica de la enfermedad. De forma adicional, se recogieron mediante entrevista y revisión de historia clínica las siguientes variables demográficas generales:

- Sexo
- Peso, talla e índice de masa corporal (IMC)

- Fecha última regla o menopausia en caso de mujeres
- Factores de riesgo cardiovascular clásicos: Consumo tabáquico activo (SÍ/NO/Exfumador), hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia o enfermedad cardiovascular establecida (enfermedad arterial periférica, cardiopatía isquémica o accidente cerebrovascular)
- Diagnóstico previo o actual de migraña

Se recogieron las siguientes variables de la EII mediante revisión de historia clínica y entrevista.

- Clasificación de EII según clasificación de Montreal
- Edad al diagnóstico de la EII
- Tiempo de evolución de la EII
- Antecedentes familiares de EII
  - Primer grado: padres, hermanos o hijos
  - Segundo grado: abuelos, tíos o nietos
- MEIs o IMIDs asociadas a la EII diagnosticadas antes de la extracción.
- Tratamiento para la EII en el momento de la extracción
- Tratamientos previos a la extracción en relación con su EII
- Intervenciones quirúrgicas relevantes
- Variables de actividad clínica
  - CU ó EII-NC: Índice de Truelove-Witts modificado >11 puntos
  - EC: Harvey Bradshaw >7 puntos
- Si disponibles en los 30 días previos a la extracción: Valor de calprotectina fecal

Para el diagnóstico de migraña en pacientes con EII, en caso de presentar cefalea en los últimos 3 meses, se empleó el cuestionario utilizado en el estudio de prevalencia de migraña en EII, en el que se incluyeron los ítems del ID-Migraine. Al igual que el estudio de prevalencia, en caso de contestar de forma positiva a dos preguntas de este cuestionario, se estableció el diagnóstico de MP mientras que, si contestaban afirmativamente a las tres preguntas, se clasificaron como MD, así como el número aproximado de episodios de migraña al mes. Los pacientes con migraña que referían cefalea más de 15 días al mes se clasificaron como MC.

Para el reclutamiento de controles sanos, se solicitó su consentimiento para extracción sanguínea, y se descartó mediante entrevista la presencia de síntomas digestivos o cefalea previa.

Para el reclutamiento de pacientes con MC, se incluyeron pacientes diagnosticados en consultas de Neurología de MC, se solicitó su consentimiento para extracción sanguínea, y se descartó mediante entrevista y revisión de historia clínica el diagnóstico previo de EII o síntomas sugestivos de EII.

### **5.3 BETA-CGRP EN COVID-19 CON DIARREA**

En el contexto de pandemia mundial por SARS-COV-2, diseñamos un estudio transversal entre diciembre de 2020 y mayo de 2021. Se recogieron muestras de sangre a los pacientes ingresados en los Servicios de Medicina Interna o Enfermedades infecciosas por infección por infección por SARS-COV-2, definida como una prueba positiva para infección aguda por SARS-COV-2, y que presentaran diarrea, definida como la presencia de más de 3 deposiciones al día. Se excluyeron pacientes con necesidad de soporte ventilatorio diferente al uso de oxígeno suplementario, ingreso en unidad de cuidados intensivos o cultivo de heces positivo para otro organismo enteropatógeno. Se compararon con pacientes sanos, pareados por edad y sexo. Para el reclutamiento de controles sanos, se solicitó consentimiento verbal para extracción sanguínea, y se descartó mediante entrevista la presencia de síntomas sugestivos de infección por SARS-COV-2, además de síntomas digestivos previos o enfermedades clínicas relevantes.

### **5.4 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ALFA-CGRP Y BETA-CGRP**

Las muestras de sangre fueron recogidas mediante punción de vena antecubital de los pacientes y controles reclutados en ayunas. Las muestras se preservaron en frío y se procesaron inmediatamente. Se permitió la coagulación de la muestra, y se separó del suero con centrifugación a 3500 revoluciones por minuto durante de 10 minutos. Las

alícuotas obtenidas mediante este procesamiento se almacenaron de forma inmediata a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Se siguieron de forma estricta los protocolos del fabricante para el análisis mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) tipo *sándwich* tanto para alfa-CGRP (Abbexa®, Reino Unido), como para beta-CGRP (Cusabio®, China). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado con ambos kits, y en todas las mediciones de aceptó un coeficiente de variación intra procedimiento del 8%, el indicado por los fabricantes. La curva estándar de todos los experimentos fue calculada generando una curva logística de cuatro parámetros (4-PL) con  $r^2 > 0,999$ . Como única diferencia entre ambos procesos, en el último paso final del ELISA, la incubación con sustrato fue realizada durante 10 minutos para alfa-CGRP y 20 minutos para el beta-CGRP. Se explica la esquematización del procedimiento en la figura 6.

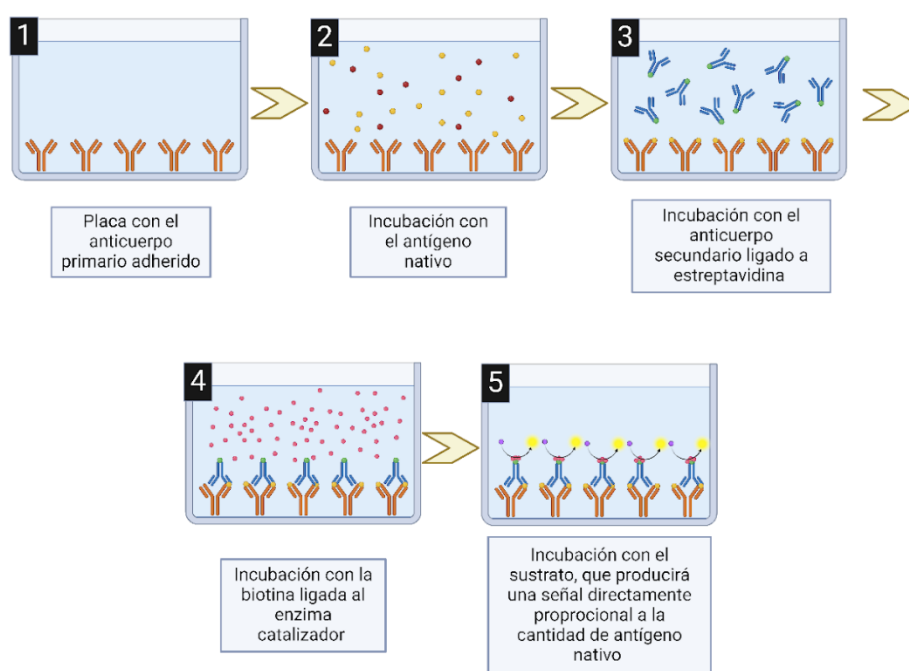
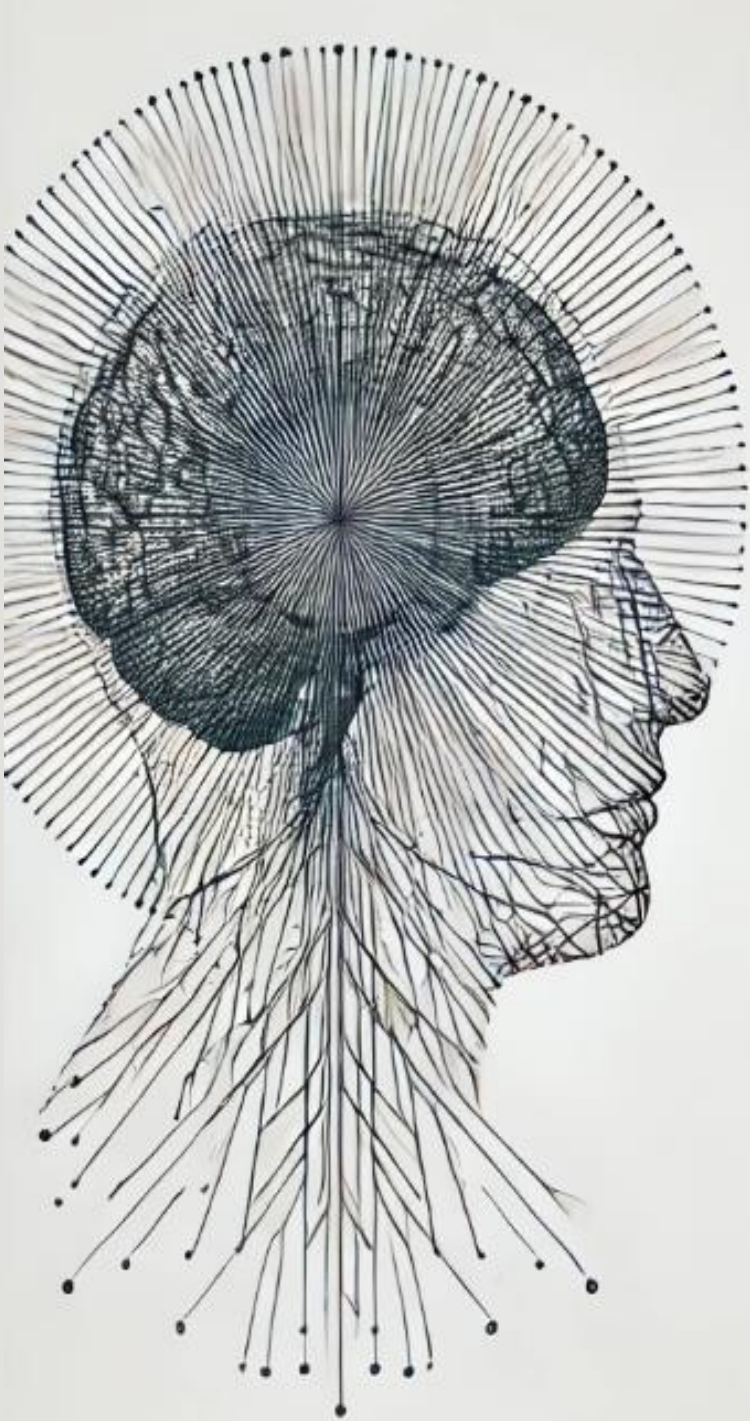


Figura 6. Esquematización de ELISA tipo *sandwich*



## 6. PUBLICACIONES





## **6.1 PRIMERA PUBLICACIÓN**

Marta Pascual-Mato, Gabriel Gárate, Carlota de Prado-Tejerina, María José García, Beatriz Castro, Vicente González-Quintanilla, Jorge Madera, Javier Crespo, Julio Pascual, Montserrat Rivero (2024). Increased prevalence of migraine in women with inflammatory bowel disease: A cross-sectional study. *Cephalalgia: an international journal of headache*, 44(3), 3331024241233979. <https://doi.org/10.1177/03331024241233979>

Cephalalgia. IF:5.0; SJR:63/398 (Q1); Neurology (Clinical).

En este primer artículo abordamos el primer objetivo de la tesis doctoral, confirmar que existe una correlación entre la migraña y EII. Se diseñó un estudio de prevalencia de migraña en pacientes con EII valorados en la unidad de EII de nuestro hospital, utilizando como base del diagnóstico de migraña el cuestionario *ID-Migraine*.



# Increased prevalence of migraine in women with inflammatory bowel disease: A cross-sectional study

Cephalalgia

2024, Vol. 44(3) 1–8

© International Headache Society 2024

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/03331024241233979

journals.sagepub.com/home/cep



Marta Pascual-Mato<sup>1</sup>, Gabriel Gárate<sup>2</sup>,  
Carlota de Prado-Tejerina<sup>2</sup>, María José García<sup>1</sup>,  
Beatriz Castro<sup>1</sup>, Vicente González-Quintanilla<sup>2</sup>, Jorge Madera<sup>2</sup>,  
Javier Crespo<sup>2</sup>, Julio Pascual<sup>2</sup>  and Monserrat Rivero<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Some studies have suggested an association between migraine and inflammatory bowel disease. We determined migraine prevalence in a cohort of patients with inflammatory bowel disease.

**Methods:** Patients with inflammatory bowel disease aged 18–65 years were interviewed using an *ad hoc* headache questionnaire. Those who admitted a history of headache in the last year answered the three questions of the ID-Migraine questionnaire. Those who answered “yes” to the three of them were classified as “definite” and those who answered “yes” to two were classified as “probable” migraine.

**Results:** We interviewed 283 patients with inflammatory bowel disease. Of these, 176 (62.2%) had headache. Fifty-nine (20.8%; 95% CI 16.3–26.0%) met migraine criteria either definite ( $n = 33$ ; 11.7%; 95% CI 8.2–16.0%) or probable ( $n = 26$ ; 9.2%; 95% CI 6.1–13.2). When divided by gender, 12 men (9.6%; 95% CI 5.1–16.2%) and 47 women (29.8%; 95% CI 22.8–37.5%) met migraine criteria. The prevalence of migraine was increased in inflammatory bowel disease patients from the current cohort (20.8%) versus that reported for our general population for the same age group (12.6%;  $p < 0.0001$ ). These differences remained significant in female inflammatory bowel disease patients (29.8% versus 17.2% in our general population;  $p < 0.0001$ ), but not in males (9.6% in inflammatory bowel disease vs 8.0%;  $p = 0.30$ ). Seventeen patients with inflammatory bowel disease (6.0%; 95% CI 3.54–9.44%) fulfilled chronic migraine criteria. There were no differences in migraine prevalence by inflammatory bowel disease subtypes.

**Conclusion:** Migraine prevalence, including chronic migraine, seems to be increased in patients with inflammatory bowel disease. The fact that this association was stronger for women suggests an influence of sex-related factors.

## Keywords

Inflammatory bowel disease, migraine, prevalence

Date received: 6 December 2023; revised: 31 January 2024; accepted: 2 February 2024

## Introduction

Migraine is often disabling by itself but also due to the co-occurrence of other chronic diseases both neuropsychiatric, including anxiety-depression, insomnia, epilepsy or stroke, and non-neuropsychiatric, such as heart disease or asthma/allergies (1). Gastrointestinal symptoms (nausea/vomiting, gastroparesis) are classical hallmarks of migraine and some gastrointestinal disorders, such as irritable bowel syndrome or celiac

<sup>1</sup>Gastroenterology and Hepatology Department, Clinical and Translational Research in Digestive Diseases, Valdecilla Research Institute (IDIVAL), Marqués de Valdecilla University Hospital, Santander, Spain

<sup>2</sup>Service of Neurology; University Hospital Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria and IDIVAL, Santander, Spain

### Corresponding author:

Julio Pascual, Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Av. Valdecilla s/n, 39008, Santander, Cantabria, Spain.

Email: julio.pascual@unican.es



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

disease, are more frequent in migraineurs as compared to the general population (2,3).

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD) and undetermined-IBD (U-IBD) is a lifetime, chronic inflammatory disorder, with some epidemiological characteristics similar to those of migraine as it is more likely to be diagnosed in children or young adults and to co-occur with other chronic conditions including depression and anxiety, asthma and some neurological disorders (4,5). Several studies have analyzed a possible comorbidity between migraine and IBD with very heterogeneous results (Table 1). Four studies, mostly coming from big insurance data-bases with incredibly low migraine prevalence, have found no association (6–9). The remaining seven (10–16) did find a numerical difference, but these differences were only significant in three of them (12–14). These three positive studies cannot be interpreted as definitive as either just used one question to diagnose migraine (14), the number of included cases was too low ( $n=80$ ) (12) or the percentages found for prevalence of migraine in IBD patients and controls (41% and 21.3%, respectively) were too high (13). Our aim, therefore, was to assess, by means of a validated questionnaire with high sensitivity and specificity also in Spanish language (17,18), a possible coexistence between migraine and IBD in a series of unselected, consecutive patients attending our IBD clinic.

## Patients and methods

### Study population and design

We performed this cross-sectional study, between 21 November 2022 and 22 February 2023. To be

included in this survey, IBD patients had to be between 18 and 65 years and have been diagnosed with IBD in our IBD Unit according to the Montreal Classification (19). After providing informed consent, consecutive patients with a confirmed diagnosis of IBD attending our Unit were interviewed using an *ad hoc* headache questionnaire (Table 2). Detailed clinical data were available for all the participants. The study received IRB approval by the Ethics Committee of Cantabria (2023/004).

IBD patients with a history of headache in the last year unrelated to head injury, hangover or a viral illness such as flu or COVID-19 were asked to answer the three questions of the ID-Migraine validated questionnaire (17). Those who answered "yes" to the three questions were classified as "definite" migraine and those who answered "yes" to two questions were classified as "probable" migraine. In these migraine patients, we also collected the subjective average frequency of headache days in the previous three months

**Table 2.** Headache questionnaire used in this study.\*

1. Did you suffer from headache last year unrelated to head injury, hangover or viral illness, such as flu or COVID-19?
2. Did you experience headache in the last three months?
3. If you had headache in the last three months, please point out the average number of days with headache:  
<15 days/month ☐ >15 days/month ☐
4. Has a headache limited your activities for a day or more in the last three months?
5. Are you nauseated or sick to your stomach when you have a headache?
6. Does light bother you when you have a headache?
7. Have you ever been diagnosed with migraine?

\*Questions 4–6 are the ID-Migraine screening questionnaire (17,18).

**Table 1.** Main results of surveys analyzing migraine prevalence in IBD.

| Author, year                   | N of IBD patients included | IBD diagnosis             | Migraine diagnosis      | Migraine prevalence, % | Migraine prevalence in controls, % |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------------------|
| Ford et al., 2009              | 100                        | IBD clinic                | ID-Migraine             | 30                     | Not available                      |
| Dimitrova et al., 2013         | 111                        | IBD clinic Health Survey  | ID-Migraine             | 14                     | <b>7</b>                           |
| Anadol Kelleci et al., 2016    | 51*                        | IBD clinic                | IHS-based questionnaire | 17.6                   | 17.6 (NS)                          |
| Cheraghi et al., 2016          | 80                         | IBD clinic                | IHS-based questionnaire | 21.3                   | <b>8.8</b>                         |
| Moisset et al., 2017           | 203                        | IBD clinic                | IHS-based questionnaire | 41                     | <b>21.3</b>                        |
| Bähler et al., 2017            | 4791                       | Insurance records         | Insurance records       | 2.2                    | 1.1 (NS)                           |
| Welander et al., 2021          | 4041 UK                    | Biobank Health Survey     | UK Biobank              | 2.9                    | 2.98 (NS)                          |
| Leitão et al., 2021            | 155                        | IBD clinic UK biobank     | IHS-base interview      | 34.2                   | 20.8 (NS)                          |
| Liu et al., 2021               | 862                        | US National Health Survey | One question**          | 28.1                   | <b>15.2</b>                        |
| Kim et al., 2022               | 1027                       | Insurance records         | IHS questionnaire       | 1.6                    | 1.1 (NS)                           |
| González-Martínez et al., 2023 | 66                         | IBD clinic                | MS-Q questionnaire***   | 34.2%                  | 20.8% (NS)                         |

All reports appearing in Pubmed journals and studying migraine prevalence in IBD patients are included here (search terms: Crohn's disease/inflammatory bowel disease/ulcerative colitis AND migraine). \*This study included only patients with Crohn's disease. \*\*Patients were just asked "if they had migraine or severe headache". \*\*\*Migraine screening questionnaire. NS: non-significant. Significant prevalence numbers appear in bold.

(more or less than 15 days a month). If participants had 15 or more headache days and a definite or probable migraine according to the questionnaire, they were defined as having chronic migraine. For all patients we collected demographic data, IBD diagnostic subtype, disease duration, hospitalizations, surgeries and medical treatments due to IBD.

### Endpoints

The primary endpoint was to determine the prevalence of migraine in a cohort of unselected IBD patients versus that reported in our general population (20). The secondary endpoints were to analyze the prevalence of migraine in IBD patients according to sex, IBD diagnostic subtype and severity and treatment of the IBD.

### Statistical analysis

Based on a reported migraine prevalence of 12.6% for our local population at 18–65 years of age (20) and an average prevalence of migraine in patients with IBD of 19% described in a recently published meta-analysis (21) we calculated that with alpha equal to 0.05 and a power of 80%, we had to include a minimum of 235 individuals.

Data are expressed as percentages with 95% confidence intervals (95% CI) calculated using the Clopper-Pearson method unless stated differently in text. Comparisons of prevalence between our IBD patients and the general population were performed using the

binomial test, inferring the hypothesized values from the reported local migraine prevalence data at 18–65 years of age (20). Comparisons of proportions found in our IBD sub-groups were carried out using Fischer's exact test.

### Results

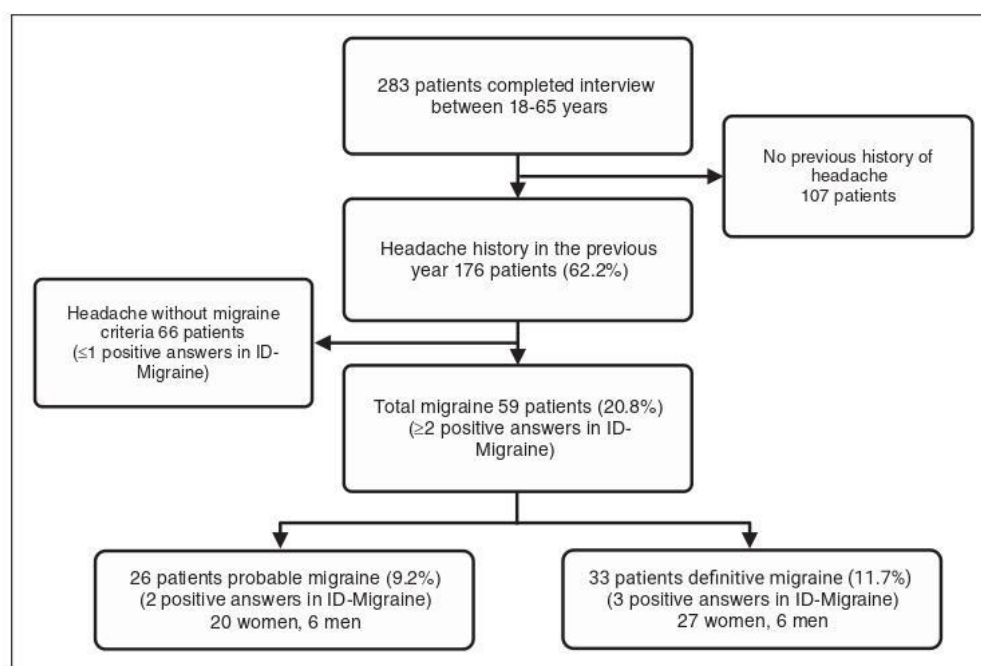
We interviewed a total of 283 consecutive IBD patients aged 18–65 years. There were 158 (55.8%) women with a mean age of 48.3 years (median 48.5 years, range 22–65 years) and 125 men (median 49 years, range 20–65 years). A total of 140 (49.1%; mean age 49.2, median 50, range 22–65 years) patients met UC criteria, 131 (46.7%; mean age 46, median 47, range 20–65 years) had CD and the remaining 12 (4.2%; mean age 46.2, median 47, range 27–62 years) were diagnosed as U-IBD. Main characteristics of this population are described in Table 3.

A total of 176 (62.2%) admitted a history of headache unrelated to head injury, hangover or a viral illness. Of those, 59 (20.85%; 95% CI 16.26–26.05%) IBD patients met migraine criteria either definite ( $n = 33$ ; 11.66%; 95% CI 8.16–15.99%) or probable ( $n = 26$ ; 9.18%; 95% CI 6.09–13.17) (Figure 1). When divided by gender, 12 men (prevalence 9.6%; 95% CI 5.06–16.17) and 47 women (prevalence 29.75%; 95% CI 22.75–37.53%) met migraine criteria. There were 17 IBD patients (6.0%; 95% CI 3.54–9.44%) who met chronic migraine criteria (11 women, eight definite and three probable migraine; prevalence 7% and six

**Table 3.** Main characteristics of total IBD population, and stratified by headache/no headache.

|                                                               | Total IBD<br>population<br>283 | No headache,<br>total<br>107 | Headache,<br>total<br>176 |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Age years                                                     |                                |                              |                           |
| - Mean $\pm$ SD                                               | 47.9 $\pm$ 11.8                | 48.9 $\pm$ 12.7              | 47.3 $\pm$ 11.3           |
| - Median (range)                                              | 49 (20–65)                     | 51 (20–65)                   | 48 (20–65)                |
| Sex, female (%)                                               | 158 (55.8)                     | 48 (44.9)                    | 110 (62.5)                |
| IBD subtypes (%)                                              |                                |                              |                           |
| - UC                                                          | 140 (49.1)                     | 56 (53.8)                    | 84 (47.7)                 |
| - CD                                                          | 131 (46.7)                     | 47 (43.9)                    | 84 (47.7)                 |
| - U-IBD                                                       | 12 (4.2)                       | 4 (3.7)                      | 8 (4.5)                   |
| Years since diagnosis of IBD                                  |                                |                              |                           |
| - Mean $\pm$ SD                                               | 9.9 $\pm$ 9.2                  | 9 $\pm$ 9.3                  | 10.4 $\pm$ 9.07           |
| - Median (range)                                              | 8 (0–36)                       | 5 (0–36)                     | 9 (0–36)                  |
| Perianal disease (%)                                          | 27 (9.5)                       | 6 (5.6)                      | 21 (11.9)                 |
| Immunomodulator treatment (%)                                 | 119 (42)                       | 39 (36.4)                    | 80 (45.4)                 |
| Biologic treatment (%)                                        | 96 (33.9)                      | 38 (35.5)                    | 58 (32.9)                 |
| Surgery (%)                                                   | 53 (18.7)                      | 18 (16.8)                    | 35 (19.9)                 |
| Hospitalizations related to IBD (%)                           | 101 (35.7)                     | 39 (36.4)                    | 62 (35.2)                 |
| Immune related diseases or extraintestinal manifestations (%) | 44 (15.6)                      | 13 (12.1)                    | 31 (17.6)                 |

SD: standard deviation, IBD: inflammatory bowel disease, UC: ulcerative colitis, CD: Crohn's disease, U-IBD undefined inflammatory bowel disease.



**Figure 1.** Flow chart of IBD patient selection and distribution.

men, three probable and three definite; prevalence 4.7%) (Table 4).

We compared these prevalence data with those reported on migraine prevalence in our country in the same age group (20). The prevalence of migraine was significantly increased in IBD patients versus that reported for our general population (12.56%; 95% CI 11.6–13.6%;  $p < 0.0001$ ). The prevalences of definite and probable migraine are also increased in IBD ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively) when compared with the general population (definite: 8.40%; 95% CI 7.69–9.15%; probable: 4.16%; 95% CI 3.7–4.7%). Stratified by sex, differences in total migraine prevalence remained significant in women (general population: 17.17%; 95% CI 15.82–18.61%;  $p < 0.0001$ ), but not in men (general population: 8.04%; 95% CI 7.10–9–10%;  $p = 0.30$ ) (Figure 2).

By IBD diagnostic subtypes, 29 (20.7%; 95% CI 14.33–28.38%; 14 probable and 15 definite) of UC, 26 (19.8%; 95% CI 13.39–27.71%; 10 probable and 16 definite) of CD and four (33.3%; 95% CI 6.81–49.90%; two probable and two definitive) of U-IBD patients met migraine diagnostic criteria. There were no significant differences in migraine prevalence between CD and UC ( $p = 0.88$ ) (Figure 3).

Regarding IBD characteristics and migraine, men with total migraine had a higher rate of use of biologic treatment (75% vs 40.7%  $p < 0.05$ ) and of immune mediated inflammatory diseases or extraintestinal manifestations of IBD (33.3% vs 9.6%  $p < 0.05$ ). These associations were not significant for women, nor for the overall population ( $p > 0.05$ ). Additionally, we did

not find any significant influence in the prevalence of migraine with/without the use of mesalazine or immunomodulators, previous surgeries or hospitalizations due to IBD, neither in total number of patients nor stratified by sex.

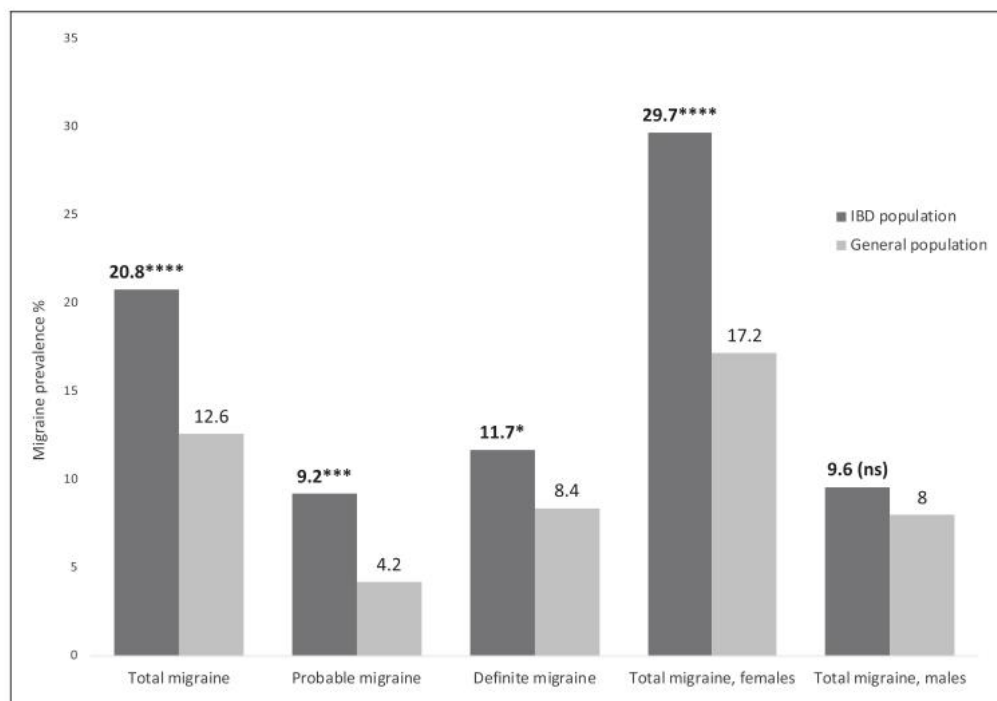
## Discussion

The main finding of this work is that one out of five (exactly 20.85%) among unselected patients with an established diagnosis of IBD met migraine criteria according to the validated ID-Migraine questionnaire (11.66% and 9.18% definite and probable criteria, respectively). There are two big surveys of migraine prevalence in the general population exactly at the age range of this study in our country (20,22). In both studies patients were interviewed using a structured questionnaire. The first, carried out in 1992 and involving 2232 subjects examined at home by neurologists, used the 1988 IHS migraine criteria and found that exactly 12% of the population (17% women and 8% men) in Spain had migraine (22). The most recent study involved 5668 subjects from the general population aged 18–65 years and found an almost identical 12.6% 1-year migraine prevalence (17.2% in males and 8.0% in females) (20). In this study, 8.4% and 4.2% met definite and probable migraine criteria, respectively. When compared with data coming from Matías-Guiu et al.'s survey (22), global migraine prevalence in our series of IBD patients was numerically and significantly increased. The same can be concluded comparing our results with those from a very recent

**Table 4.** Main characteristics of IBD population, stratified by headache without migraine, total migraine, probable migraine and definite migraine.

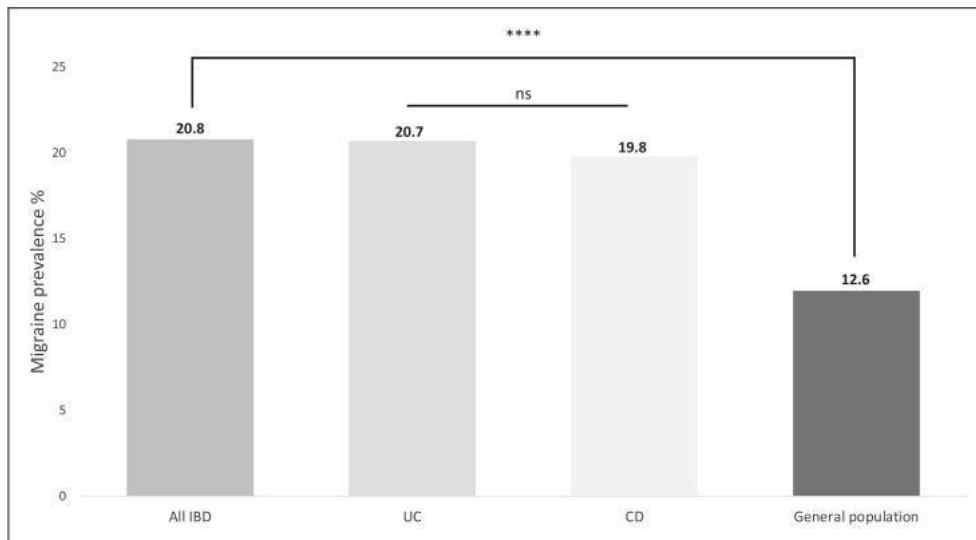
|                                                               | Headache without<br>migraine<br>n = 117 | Total<br>migraine<br>n = 59 | Probable<br>migraine<br>n = 26 | Definite<br>migraine<br>n = 33 |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Age years                                                     |                                         |                             |                                |                                |
| - Mean $\pm$ SD                                               | 47.2 $\pm$ 11.5                         | 47.25 $\pm$ 11.1            | 46 $\pm$ 10.6                  | 48.2 $\pm$ 11.6                |
| - Median (range)                                              | 48 (22–65)                              | 46 (20–65)                  | 46 (20–61)                     | 48 (23–65)                     |
| Sex, female (%)                                               | 63 (53.8)                               | 47 (79.7)                   | 20 (76.9)                      | 27 (81.8)                      |
| IBD subtypes (%)                                              |                                         |                             |                                |                                |
| - UC                                                          | 55 (47.0)                               | 29 (49.2)                   | 14 (53.8)                      | 15 (45.5)                      |
| - CD                                                          | 58 (49.6)                               | 26 (44.1)                   | 10 (38.5)                      | 16 (48.5)                      |
| - U-IBD                                                       | 4 (3.4)                                 | 4 (6.8)                     | 2 (7.7)                        | 2 (6.1)                        |
| Years since diagnosis of IBD                                  |                                         |                             |                                |                                |
| - Mean $\pm$ SD                                               | 10.7 $\pm$ 9.5                          | 9.9 $\pm$ 8.2               | 9.6 $\pm$ 8.4                  | 10.2 $\pm$ 8.2                 |
| - Median (range)                                              | 9 (0–36)                                | 8 (0–33)                    | 8 (1–33)                       | 10 (0–36)                      |
| Perianal disease (%)                                          | 14 (12.0)                               | 7 (11.9)                    | 5 (19.2)                       | 2 (6.1)                        |
| Immunomodulator treatment (%)                                 | 56 (47.9)                               | 24 (40.7)                   | 9 (34.6)                       | 15 (45.5)                      |
| Biologic treatment (%)                                        | 40 (34.2)                               | 18 (30.5)                   | 8 (30.8)                       | 10 (30.3)                      |
| Surgery (%)                                                   | 25 (21.4)                               | 10 (16.9)                   | 5 (19.2)                       | 5 (15.1)                       |
| Hospitalization (%)                                           | 40 (34.2)                               | 21 (35.6)                   | 10 (38.5)                      | 11 (33.3)                      |
| Immune related diseases or extraintestinal manifestations (%) | 15 (12.8)                               | 16 (27.1)                   | 7 (26.9)                       | 9 (27.3)                       |
| >15 days of migraine/month                                    |                                         | 17 (28.8)                   | 6 (23.1)                       | 11 (33.3)                      |

SD: standard deviation, IBD: inflammatory bowel disease, UC: ulcerative colitis, CD: Crohn's disease, U-IBD undefined inflammatory bowel disease.

**Figure 2.** Migraine prevalence in our IBD patients versus the general population. Notice that prevalence of total, probable and definite migraine in IBD patients was significantly higher than those of the general population, but only for females. General population data taken from reference 20. ns: non-significant; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001.

meta-analysis, which has calculated that 15.2% of the population aged 20–65 years (18.6% of women and 8.7% of men) suffers from active migraine (23). As shown in Table 1, results from 11 previous reports

testing this possible association are heterogenous. Although our final numbers are low to draw definitive conclusions and our study does not include a longitudinal follow-up, the proportion of our IBD patients



**Figure 3.** Prevalence of migraine in IBD and main IBD subtypes (UC and CD) versus our general population showing a significant, uniform increase in migraine prevalence for IBD, CD and UC. General population data taken from reference 20. ns: non-significant; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

who would meet chronic migraine criteria (6%) are also clearly higher than those reported globally (24) and specifically in our region (2%) (25), which suggests not only an association between IBD and migraine, but that the presence of IBD would predispose to migraine chronicity.

We also show that global migraine prevalence remains higher than that of the general population in, CD and UC, the two main types of IBD, a question unexamined in those studies which had found a significant association between IBD and migraine. What could be the reasons for such migraine and IBD comorbidity? By definition, IBD is a chronic (systemic) inflammatory disease (4,5) and inflammation might play a role in migraine initiation and chronification (26). Migraine has been shown to be associated with other inflammatory disorders and neurogenic inflammation, with increased expression of proinflammatory cytokines, including interleukins 1 $\beta$ , 6 and 8, and tumor necrosis factor alpha, has been linked to migraine pathophysiology (26). This comorbidity between migraine and IBD could be another example of the bidirectional relationship between the gastrointestinal and the central nervous system known as the “gut-brain axis”, which has been involved in the pathophysiology of migraine in other gastrointestinal disorders, such as celiac disease, irritable bowel syndrome or *Helicobacter* infection (27). The mechanisms of how brain and the gut interact in migraine patients are not entirely clear, but changes in the microbiota and in the biochemistry of neuronal innervation on the gastrointestinal tract could be implicated. Microbiota prevents systemic inflammation and plays a key role in nociception by preparing host adaptation to stress factors (27,28). The neuronal influence on the inflammatory

status of the gastrointestinal tract is well-demonstrated involving a variety of neurotransmitters, such as serotonin, and of pain-producing neuropeptides, including calcitonin gene-related peptide (CGRP). CGRP has been shown to exert a key role in both migraine and gut mucosa homeostasis: an excess of CGRP induces migraine pain and diarrhea (29), while lack of CGRP induces colitis and spontaneous lymphoid hyperplasia, which indicates a protective role in bowel inflammation (30).

There are other factors which could contribute to this association. The association between migraine and IBD was only significant for females, which could suggest a role for sex-linked factors, such as oestrogens (31,32) or even genetic predisposition depending on sexual chromosomes (33). On the other hand, non-steroidal anti-inflammatory agents are the most popular acute treatment of migraine and they have been shown to have the potential to trigger the onset or relapse of IBD (34).

Even though all patients with IBD — regardless of their clinical situation — are followed in our IBD Clinic, one limitation of our study is that it was conducted in a specialized clinic in a tertiary-care center and, therefore, their results are not necessarily transposed to the generality of IBD subjects. Although our study contains the highest number of subjects tested in this regard in a specialized IBD clinic (see Table 1), it is true that we should be cautious on interpreting results coming from subgroups with a final low number of subjects, such as males or chronic migraineurs, as definitive. In spite of its high sensitivity (0.92) and specificity (0.82) for migraine diagnosis (18), ID-Migraine questionnaire is a screening tool rather than a diagnosis made by an expert physician. Finally, one further

limitation is that there was no simultaneous, matched control group from the general population to compare migraine prevalence, but we think that the very consistent results from the two big prevalence studies in our country (and those of the recent metanalysis of migraine prevalence in Europe) make a fair comparison possible.

## Conclusions

This cross-sectional study supports previous surveys reporting an association between IBD and migraine. The fact that this association was stronger for women suggests an influence of sex-related factors.

## Article highlights

- IBD and migraine are comorbid diseases; the presence of IBD could contribute to migraine chronicity.
- This comorbidity was significant only for women, which suggests an influence of sex-related factors.

## Acknowledgments

We are very grateful to our IBD nurse María Soledad Serrano for her continuous support.

## Declarations of conflicting interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study has been founded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project PI20/01358 and co-funded by Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER), “Una manera de hacer Europa”.

## ORCID iD

Julio Pascual  <https://orcid.org/0000-0002-3189-7573>

## References

1. Buse DC, Reed ML, Fanning KM, et al. Comorbid and co-occurring conditions in migraine and associated risk of increasing headache pain intensity and headache frequency: results of the migraine in America symptoms and treatment (MAST) study. *J Headache Pain* 2020; 21: 23.
2. Cole JA, Rothman KJ, Cabrla HJ, et al. Migraine, fibromyalgia, and depression among people with IBS: a prevalence study. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 26.
3. van Hemert S, Bredveld AC, Rovers JMP, et al. Migraine associated with gastrointestinal disorders: review of the literature and clinical implications. *Front Neurol* 2014; 5: 241.
4. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis. *Lancet* 2017; 389: 1756–1770.
5. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, et al. Crohn's disease. *Lancet* 2017; 389: 1741–1755.
6. Anadol Kelleci U, Calhan T, Sahin A, et al. The prevalence of headache in Crohn's disease: single-center experience. *Gastroenterol Res Pract* 2016: 6474651.
7. Bähler C, Schoepfer AM, Vavricka SR, et al. Chronic comorbidities associated with inflammatory bowel disease: prevalence and impact on healthcare costs in Switzerland. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2017; 29: 916–925.
8. Welander NZ, Olivo G, Pisanu C, et al. Migraine and gastrointestinal disorders in middle and old age: A UK biobank. *Brain Behav* 2021; 11: e2291.
9. Kim J, Lee S, Rhew K. Association between gastrointestinal diseases and migraine. *Int J Environ Res Public Health* 2022; 19: 4018.
10. Ford S, Finkert AG, Isaacs KI. Migraine in patients with inflammatory bowel disorders. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 499.
11. Dimitrova AK, Ungaro RC, Lebwohl B, et al. Prevalence of migraine in patients with celiac disease and inflammatory bowel disease. *Headache* 2013; 53: 344–355.
12. Cheraghi SC, Daryani NE, Ghabaee M. A survey of migraine prevalence in patients with inflammatory bowel disease—a single centre experience. *Middle East J Dig Dis* 2016; 8: 282–288.
13. Moisset X, Bommelaer G, Boube M, et al. Migraine prevalence in inflammatory bowel disease patients: a tertiary-care centre cross-sectional study. *Eur J Pain* 2017; 21: 1550–1560.
14. Liu Y, Xu F, Wheaton AG, et al. The association between inflammatory bowel disease and migraine or severe headache among US adults: Findings from the National Health Interview Survey, 2015–2016. *Headache* 2021; 61: 612–616.
15. Leitão AMF, Ribeiro Junio HL, Araújo DF, et al. Neuropathy and primary headaches affect different subgroups of inflammatory bowel disease patients. *Neurol Sci* 2021; 42: 935–942.
16. González-Martínez A, Muro I, Quintas S, et al. Headache in patients with inflammatory bowel disease: migraine prevalence according to the Migraine Screening-Questionnaire (MS-Q) and headache characteristics. *Gastroenterol Hepatol*. Epub ahead of print 2023 May 5.
17. Lipton RB, Dodick D, Sadovsky R, et al. A self-administered screener for migraine in primary care. The ID Migraine™ validation study. *Neurology* 2003; 61: 375–382.
18. Rodríguez-Rivas R, Moreno-Martínez C. Translation and validation to Spanish of the diagnostic test ID-Migraine. *Neurology* 2022; 98: 98.

19. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19: 5A–36A.
20. Matías-Guiú J, Porta-Etessam J, Mateos V, et al. One-year prevalence of migraine in Spain: a nationwide population-based survey. *Cephalalgia* 2011; 31: 463–470.
21. Olfati H, Mirmosayyeb O, Hosseinabadi AM, et al. The prevalence of migraine in inflammatory bowel disease, a systematic review and meta-analysis. *Int J Prev Med* 2023; 14: 66.
22. Láinez MJA, Vioque J, Hernández-Aguado I, et al. Prevalence of migraine in Spain. An assessment of the questionnaire's validity by clinical interview. In: J Olesen (ed.) *Headache Classification and Epidemiology*. New York: Raven Press, 1994, pp. 221–225.
23. Stovner LJ, Hagen K, Linde M, et al. The global prevalence of headache: an update, with analysis of the influences of methodological factors on prevalence estimates. *J Headache Pain* 2022; 23: 34.
24. Natoli JL, Manack A, Dean B, et al. Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia* 2010; 30: 599–609.
25. Castillo J, Muñoz P, Guitera V, et al. Kaplan Award 1998. Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache* 1999; 39: 190–196.
26. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K. Does inflammation have a role in migraine? *Nat Rev Neurol* 2019; 15: 483–490.
27. Arzani M, Jahromi SR, Ghorbani Z, et al. Gut-brain axis and migraine headache: a comprehensive review. *J Headache Pain* 2020; 21: 15.
28. He Q, Wang W, Xiong Y, et al. A causal effects of gut microbiota in the development of migraine. *J Headache Pain* 2023; 24: 90.
29. Falkenberg K, Bjerg HR, Olesen J. Two-hour infusion causes gastrointestinal hyperactivity: possible relevance for CGRP antibody treatment. *Headache* 2020; 60: 929–937.
30. Thompson BJ, Washington MK, Kurre U, et al. Protective roles of alpha-calcitonin and beta-calcitonin gene-related peptide in spontaneous and experimentally induced colitis. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 229–241.
31. Jacenik D, Cygankiewicz AI, Mokrowiecka A, et al. Sex- and age-related estrogen signalling alteration in inflammatory bowel diseases: modulatory role of estrogen receptors. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3175.
32. van der Giessen J, van der Woude CJ, Peppelenbosch MP, et al. A direct effect of sex hormones on epithelial barrier function in inflammatory bowel disease models. *Cells* 2019; 8: 261.
33. Lee HS, Oh H, Yang SK, et al. X chromosome-wide association study identifies a susceptibility locus for inflammatory bowel disease in Koreans. *J Crohn's Colitis* 2017; 11: 820–830.
34. Habib I, Mazulis A, Roginsky G, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical associations. *Inflamm Bowel Dis* 2017; 20: 2493–2502.



## **6.2 SEGUNDA PUBLICACIÓN**

Marta Pascual-Mato, Gabriel Gárate, Vicente González-Quintanilla, Jorge Madera-Fernández, Beatriz Castro, María José García, Javier Crespo, Montserrat Rivero, Julio Pascual. (2024). Differences in circulating alpha-calcitonin gene-related peptide levels in inflammatory bowel disease and its relation to migraine comorbidity: A cross-sectional study. *Headache*, 64(7), 849–858. <https://doi.org/10.1111/head.14768>

Headache IF:5.4; SJR: 74/398 (Q1); Neurology (Clinical)

En esta publicación abordamos el segundo objetivo de la tesis doctoral, valorar los niveles de alfa-CGRP en pacientes con EII. Teniendo en cuenta que esta molécula se ha estudiado casi exclusivamente en el ámbito de la neurología y las cefaleas, es importante estratificar a los pacientes por diagnóstico previo de migraña, para poder demostrar un papel independiente de su diagnóstico, y las posibles implicaciones reales de esta molécula en la EII.

## RESEARCH SUBMISSION

# Differences in circulating alpha-calcitonin gene-related peptide levels in inflammatory bowel disease and its relation to migraine comorbidity: A cross-sectional study

Marta Pascual-Mato MD<sup>1</sup>  | Gabriel Gárate BBiot<sup>2</sup>  |  
Vicente González-Quintanilla MD PhD<sup>2</sup> | Jorge Madera-Fernández MD<sup>2</sup> |  
Beatriz Castro MD PhD<sup>1</sup> | María José García MD<sup>1</sup> | Javier Crespo MD PhD<sup>1</sup>  |  
Montserrat Rivero MD PhD<sup>1</sup> | Julio Pascual MD PhD<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Gastroenterology and Hepatology Department, Clinical and Translational Research in Digestive Diseases, Valdecilla Research Institute (IDIVAL), Marqués de Valdecilla University Hospital, Santander, Spain

<sup>2</sup>Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria and IDIVAL, Santander, Spain

## Correspondence

Julio Pascual, Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Av. Valdecilla s/n, Santander 39008, Spain.  
Email: [pascualj@unican.es](mailto:pascualj@unican.es)

## Funding information

Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: PI20/01358

## Abstract

**Objective:** To analyze the specificity of calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels, we measured alpha-CGRP circulating levels in a large series of patients with a recent diagnosis of inflammatory bowel disease (IBD) who were interviewed regarding comorbid headache.

**Background:** Several studies have found an association between migraine and IBD.

**Methods:** In this cross-sectional study performed in an IBD clinic, morning serum alpha-CGRP levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in 96 patients who were recently diagnosed with IBD and compared to those from 50 similar patients with chronic migraine (CM) and 50 healthy controls (HC).

**Results:** Alpha-CGRP levels were higher in patients with IBD (median [interquartile range] 56.9 [35.6–73.9] pg/mL) and patients with CM (53.0 [36.7–73.9] pg/mL) compared to HC (37.2 [30.0–51.8] pg/mL;  $p=0.003$ ;  $p=0.019$ , respectively). Regarding IBD diagnostic subtypes, alpha-CGRP levels for ulcerative colitis ( $67.2 \pm 49.3$  pg/mL; 57.0 [35.6–73.4] pg/mL) and Crohn's disease ( $54.9 \pm 27.5$  pg/mL; 57.7 [29.1–76.1] pg/mL) were significantly higher than those of HC ( $p=0.013$ ,  $p=0.040$ , respectively). Alpha-CGRP levels were further different in patients with IBD with migraine (70.9 [51.8–88.7] pg/mL) compared to HC ( $p<0.001$ ), patients with IBD without headache (57.5 [33.3–73.8] pg/mL;  $p=0.049$ ), and patients with IBD with tension-type headache but without migraine (41.7 [28.5–66.9] pg/mL;  $p=0.004$ ), though alpha-CGRP levels in patients with IBD without migraine (53.7 [32.9–73.5] pg/mL) remained different over HC ( $p=0.028$ ).

**Conclusion:** Together with CM, circulating alpha-CGRP levels are different in patients with IBD, perhaps reflecting a chronic inflammatory state. IBD is an example of how alpha-CGRP levels are not a totally specific migraine biomarker. However, alpha-CGRP

**Abbreviations:** CD, Crohn's disease; CGRP, calcitonin gene-related peptide; CM, chronic migraine; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HC, healthy controls; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis; U-IBD, unclassified inflammatory bowel disease.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Author(s). *Headache: The Journal of Head and Face Pain* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Headache Society.

levels were further increased in patients with IBD who have a history of migraine, which reinforces its role as a biomarker in migraine patients, always bearing in mind their comorbidities.

### Plain Language Summary

Alpha-calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels may be a potential migraine biomarker, but it is unclear if this is the case because changes in CGRP concentrations can also be present in other conditions. We measured morning serum alpha-CGRP levels in 96 patients with a recent inflammatory bowel disease (IBD) diagnosis, and compared them to 50 matched healthy participants and 50 matched patients with chronic migraine (CM). We found a significant increase in serum alpha-CGRP levels in both patients with IBD and CM compared to healthy controls, which we think may reflect chronic inflammation found in IBD; these results offer another example that alpha-CGRP concentrations are not totally specific for migraine.

### KEYWORDS

alpha-calcitonin gene-related peptide, calcitonin gene-related peptide, chronic migraine, Crohn's disease, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis

## BACKGROUND

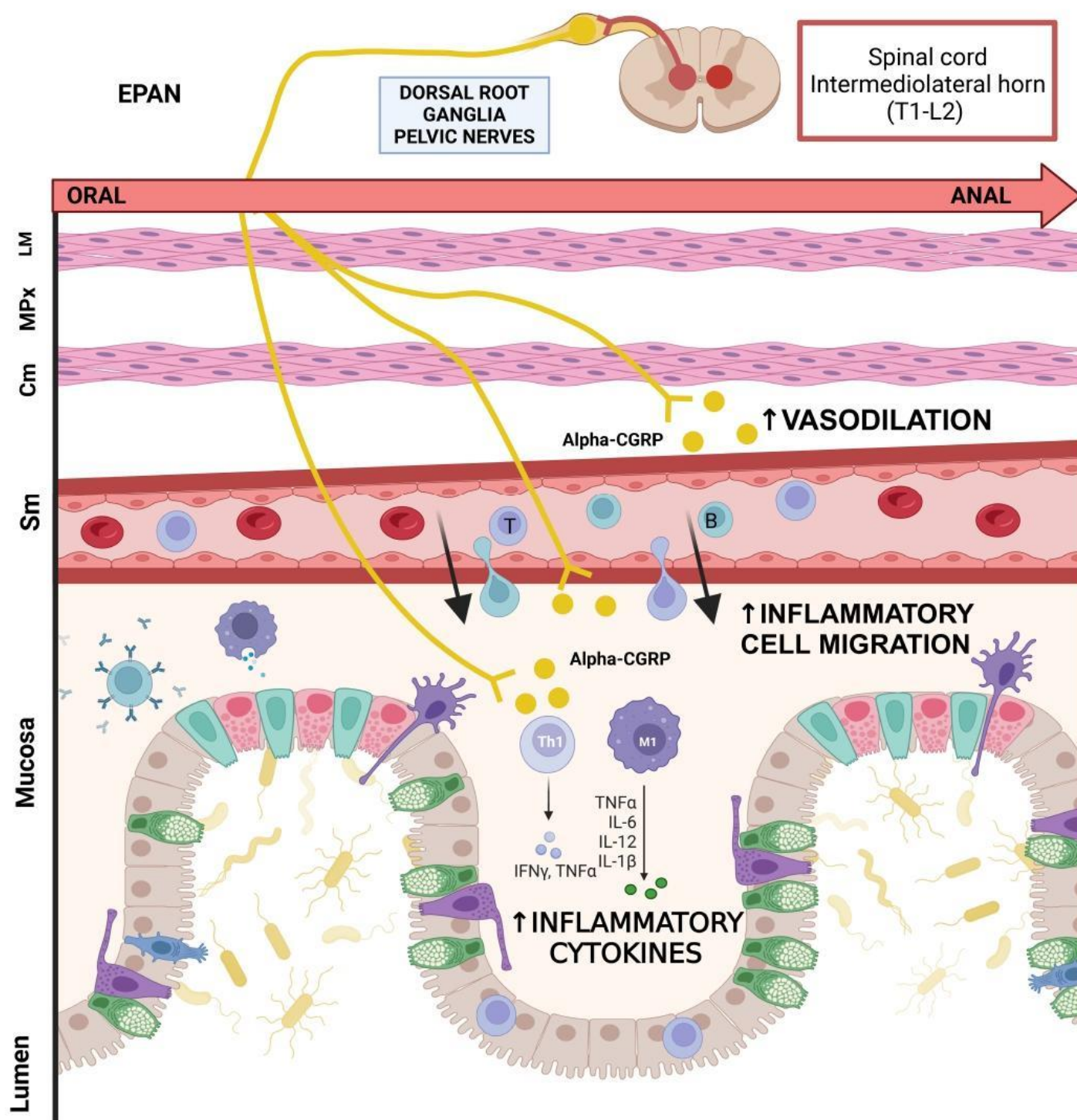
Migraine diagnosis is purely based on clinical criteria and, therefore, contains a subjective component. The availability of a validated migraine biomarker would allow an objective diagnosis and follow-up evaluation after treatment.<sup>1</sup> A variety of neuroimaging, neurophysiological, and biochemical measures have been tested as diagnostic or prognostic biomarkers in migraine,<sup>2</sup> but none seem to be consistent and fully specific. Having said that, calcitonin gene-related peptide (CGRP) has been the only neurotransmitter reliably shown to be released acutely during migraine attacks and interictally increased in patients with chronic migraine (CM) in several body fluids, including peripheral blood,<sup>2-5</sup> saliva,<sup>6</sup> tears,<sup>7</sup> and cerebrospinal fluid.<sup>8</sup> Increased CGRP levels have been shown to decrease and correlate with the clinical response after treatment with onabotulinumtoxinA<sup>5,9</sup> or CGRP monoclonal antibodies in CM.<sup>10,11</sup> Therefore, CGRP might be a specific and sensitive CM biomarker; however, such a role must be taken with caution as not every study has found increased CGRP levels in patients with migraine versus controls.<sup>12</sup> There are several doubts to be clarified in this regard. Some of them are methodological, such as the influence of the very short half-life of this neuropeptide or the heterogeneous enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests currently in the market and their specificity on measuring total, alpha-, or beta-CGRP.<sup>13</sup> Other doubts regard the specificity of the increased CGRP levels for migraine. Even though CGRP levels remain in the range of controls in chronic tension-type headache,<sup>14</sup> cervicogenic headache,<sup>15</sup> or fibromyalgia,<sup>16</sup> CGRP levels have been shown to be increased in other primary headaches, such as cluster headache<sup>17</sup> or hemicrania continua,<sup>18</sup> and in diseases like obesity<sup>19</sup> or COVID-19 infection,<sup>20,21</sup> in which inflammation plays a role. It would be convenient, then, to test the specificity of CGRP levels as a potential migraine biomarker, and mainly of the alpha-CGRP, as the isoform

involved in migraine pathophysiology in conditions that are comorbid with migraine.

Several epidemiological studies have found a significant comorbid association between migraine and inflammatory bowel disease (IBD).<sup>22-26</sup> IBD, including mainly Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), involves chronic inflammation and disturbance of the gut immune system.<sup>27</sup> In IBD, the epithelial barrier is breached, allowing luminal microbiota to enter, stimulating a proinflammatory immune response. The mucosal injury, entry of luminal factors, and cytokine release overwhelm tissue protection and repair. The cause of IBD remains unknown, and its pathogenesis is complex, encompassing genetic and epigenetic factors, microbiota, and immunological abnormalities.<sup>27</sup>

The neuronal influence on the inflammatory state of the gastrointestinal tract in IBD is well known,<sup>28,29</sup> and gut immune cells express receptors for a range of neurotransmitters, including CGRP, substance P, vasoactive intestinal peptide, or nitric oxide synthase.<sup>30,31</sup> CGRP and its two isoforms (alpha and beta) have distinctive actions. While beta-CGRP is primarily released by primary afferent Dogiel type 2 neurons in the enteric nervous system, alpha-CGRP is liberated by neurons from the vagus nerve and the dorsal root ganglia in the spinal cord via splanchnic and pelvic nerves.<sup>32</sup> With respect to alpha-CGRP functions, they include vasodilation of submucosal vessels, stimulation of peristalsis and gastrointestinal propulsion, inflammatory cell migration from blood vessels, and increased cytokine liberation (Figure 1).<sup>33,34</sup>

In this study, we measured peripheral alpha-CGRP levels in patients with a recent diagnosis of IBD. Our aim was to analyze alpha-CGRP levels, taking into account the coexistence of headache and migraine, particularly in patients with IBD. IBD results were compared to those from two further groups: patients with CM and healthy controls (HC). We hypothesized that alpha-CGRP concentrations would show differences among the three groups and that migraine comorbidity could influence the peptide concentrations in patients with IBD.



**FIGURE 1** Gastrointestinal tract innervation with emphasis on efferent neuronal pathways involved in CGRP release. Alpha-CGRP is liberated by sensory EPANs, located in DGR and supplying the gut via splanchnic nerves and pelvic nerves. Alpha-CGRP release increases gastrointestinal anal propulsion and vasodilation, while promoting inflammatory cell migration and proinflammatory cytokine liberation. See Holzer and Holzer-Petsche<sup>33</sup> and Tan et al.<sup>34</sup> for additional information. Created with BioRender.com. B, B lymphocytes; CGRP, calcitonin gene-related peptide; Cm, circular muscle layer; DC, dendritic cell; DGR, dorsal root ganglia; EPANs, extrinsic primary afferent neurons; IFN $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; LM, longitudinal muscle layer; MPx, myenteric plexus; Sm, submucosal layer; T, T lymphocytes; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

## METHODS

### Study participants

Participants aged >17 years with a recent diagnosis of IBD and classified according to the Montreal Classification<sup>35</sup> were recruited from

our IBD Unit from January 2021 to March 2023. To be included, patients with IBD had to have a new, recent (<1 year) IBD diagnosis. Patients on biologics or immunosuppressants were excluded. We allowed only treatment with mesalazine or corticosteroids. All patients with IBD who referred to a history of headache were interviewed by a neurologist from our Headache Unit, who diagnosed

their headache according to current criteria.<sup>36</sup> We registered autoimmune comorbidities and/or extraintestinal manifestations and cardiovascular risk factors. We considered as a significant cardiovascular risk factor the presence of active smoking, arterial hypertension, dyslipemia, diabetes mellitus, body mass index  $>30\text{ kg/m}^2$ , and cardiovascular events.

Data from patients with IBD were compared to those coming from two groups: CM patients and HC. First, a group of comparable patients who met current CM criteria<sup>36</sup> was recruited in our Headache Unit. They were all taking oral preventive drugs for migraine, but no patient with CM was on anti-CGRP injectable or oral medications. Samples obtained in CM cases who were migraine free and had not taken any acute medication in the previous 24 h of blood extraction were analyzed. Second, as HC, we recruited, specifically for this work, healthy individuals with similar age and sex distribution as the IBD group (medical students, residents, nurses, or physicians from our hospital, or patients' relatives) with subjective absence of headache, without a history of migraine or IBD, and who were not taking any medication for the previous 24 h of blood extraction.

Exclusion criteria for all groups were being pregnant or breast feeding, excessive use of alcohol, and serious, active somatic, or psychiatric diseases. Recruitment was performed simultaneously for the three groups. The study received institutional review board approval by the Ethics Committee of Cantabria (28/2020). All participants gave written informed consent.

### Blood extraction and serum processing

Patients were asked to keep a minimum fasting time of 12 h prior to blood extraction. Blood samples from antecubital veins were obtained in our outpatient clinics in the morning (9:00 a.m.–12:00 p.m.) as a part of the research study. After extraction, the samples were left to clot for 10 min, then centrifuged at 3500 rpm and 4°C for 10 min, immediately transferred into sterile tubes, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples were frozen within 30 min, and none remained cryopreserved for more than 6 months before being analyzed.

### Laboratory procedures

Alpha-CGRP levels were determined using a commercial ELISA specific for alpha-CGRP (Abbexa) following the manufacturer's instructions. For the last step of the ELISA process, in which manufacturers give a window of time specifying that the user must determine the optimum, we incubated the plates with the substrate for 20 min after internal validation. All samples were measured in duplicate, and all measurements met the quality criteria set by manufacturers, having an intra-assay coefficient of variation below 8%. A standard curve was generated for every single incubation, and they were calculated using a four-parameter logistic regression with  $r^2 > 0.999$ . Besides the standards, to ensure the results' reproducibility, we included

in each ELISA plate at least 10 previously assayed samples and obtained an inter-assay variability of  $< 10\%$ .

### Statistical analysis

Categorical variables are reported as percentages, whereas continuous variables are displayed as mean  $\pm$  standard deviation for normally distributed data and as median with interquartile range for non-normally distributed data unless stated differently in the text. The normality assumption of quantitative variables has been checked using the D'Agostino & Pearson test. Significance between groups of continuous variables following normal distribution was assessed by independent samples *t*-test. For non-normally distributed data, the Mann-Whitney U test was performed. For multiple group comparisons, we performed the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test.

The *p* values presented are for two-tailed testing, and we considered a  $p < 0.05$  to prove statistical significance. All analyses were performed using GraphPad Prism version 9.4.1 (GraphPad Software).

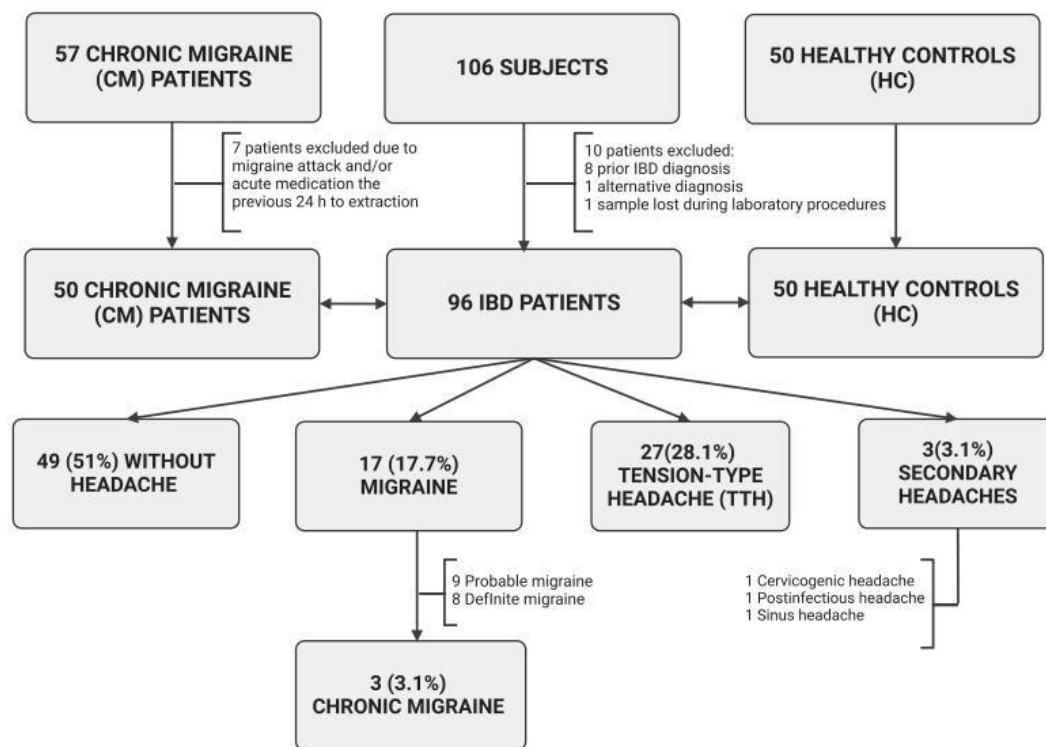
Based on our data from previous studies measuring alpha-CGRP in patients with COVID-19 and patients with CM,<sup>11,20,21</sup> we calculated that with an expected difference between means of 33% between the IBD and the HC groups, an estimated concentration for this latter group of  $40 \pm 21\text{ pg/mL}$ , an enrollment ratio of 1:1, alpha equal to 0.05, and a power of 80%, we had to include a minimum of 41 individuals per group.

## RESULTS

### Baseline patient characteristics

We asked 106 patients with IBD to participate in the study; none of them declined the invitation. Ten patients with IBD were excluded: eight patients had an IBD diagnosis longer than 1 year upon review of clinical history, one had an alternative diagnosis after surgery (ischemic ileitis), and one blood sample was lost during the laboratory procedures. Among the CM cases, seven were excluded due to a migraine attack and/or having taken acute medication the previous 24 h (Figure 2). In the end, we included 96 IBD cases (age  $47 \pm 17$  years, range 18–82 years; 60 [62.5%] women), 50 patients with CM (age  $47 \pm 11$  years, range 18–82 years; 38 [76.0%] women), and 50 HC (age  $48 \pm 16$  years, range 23–77 years; 31 [62.0%] women).

There were no missing data for the included participants. Among patients with IBD, 47 (49.0%) met diagnostic criteria for UC, 43 (44.8%) for CD, and 6 (6.2%) for unclassified-IBD (U-IBD). The mean time from diagnosis to blood extraction was  $74.9 \pm 64.5$  days (median: 55.5 days; range: 0–250 days). Regarding treatments, 72 (75%) patients were treated with either corticosteroids, mesalazine, or a combination. Fourteen patients (14.6%) had at least one associated autoimmune disorder or extraintestinal manifestation of IBD. Forty-five patients (46.9%) had one vascular risk factor (Table 1). A total of 47 (49.0%) patients with IBD admitted a history of headache.



**FIGURE 2** Flow diagram of participants, controls, and patients included and excluded in the study. IBD, irritable bowel disease.

Seventeen (17.7%) met migraine criteria (9 [9.4%] probable migraine and 8 [8.3%] definite migraine). Three (3.1%) patients with IBD met CM criteria (Figure 2). Only one patient with IBD and migraine was on preventive treatment (metoprolol). Out of the 30 remaining with headache, 27 (28.1%) met tension-type headache diagnostic criteria, and 3 (3.1%) had secondary headaches.

### Alpha-CGRP levels

As part of the primary analysis of the data, we compared alpha-CGRP circulating levels in patients with IBD ( $61.3 \pm 39.7$  pg/mL;  $56.9$  [35.6–71.8] pg/mL) and those obtained from patients with CM ( $59.4 \pm 32.6$  pg/mL;  $53.0$  [36.7–73.9] pg/mL), with the concentrations measured from HC ( $45.9 \pm 28.0$ ;  $37.2$  [30.0–51.8] pg/mL) showing significant differences ( $p=0.003$  and  $p=0.019$ , respectively; Figure 3A). As a secondary analysis, we compared alpha-CGRP concentrations according to the IBD diagnostic subtype. Alpha-CGRP levels for UC ( $67.2 \pm 49.3$  pg/mL;  $57.0$  [35.6–73.4] pg/mL) and CD ( $54.9 \pm 27.5$  pg/mL;  $57.7$  [29.1–76.1] pg/mL) were significantly different to those of HC ( $p=0.013$  and  $p=0.040$ , respectively), while alpha-CGRP for U-IBD remained only numerically higher ( $60.1 \pm 20.7$  pg/mL;  $57.3$  [43.0–77.9] pg/mL,  $p=0.255$ ; Figure 3B).

Also, as part of the primary analysis, we conducted a pre-planned multiple-group comparison of our IBD group once classified as migraine, tension-type headache, or absence of headache, and HC. Alpha-CGRP levels were statistically different in those patients with IBD who met migraine criteria ( $73.0 \pm 27.9$  pg/mL;  $70.9$  [51.8–88.7] pg/mL) versus patients with IBD without migraine ( $58.8 \pm 41.4$  pg/mL;  $53.7$  [32.9–73.5] pg/mL;  $p=0.046$ ), versus patients with IBD with tension-type

headache ( $52.7 \pm 40.7$  pg/mL;  $41.7$  [28.5–66.9] pg/mL;  $p=0.004$ ), as well as versus those who did not have headache ( $59.5 \pm 35.3$  pg/mL;  $57.5$  [33.3–73.8] pg/mL;  $p=0.049$ ). Moreover, alpha-CGRP levels in IBD subgroups with and without migraine remained significantly different compared to HC ( $p<0.001$  and  $p=0.028$ , respectively; Figure 4). Post hoc analysis revealed that three patients with IBD met CM criteria; their alpha-CGRP levels being  $74.5 \pm 7.3$  pg/mL.

### Influence of clinical factors in alpha-CGRP levels

This is a secondary analysis performed post hoc of the previously analyzed data to check whether different comorbidities related to CGRP could influence the differences found in our IBD group from the primary analysis. No significant differences arose when patients in the IBD group were classified by presence/absence of cardiovascular risk factors (yes:  $54.7 \pm 35.6$  pg/mL;  $55.0$  [24.0–73.82] vs. no:  $66.7 \pm 42.4$  pg/mL;  $58.3$  [37.5–75.2]  $p=0.298$ ), autoimmune comorbidities (yes:  $57.9 \pm 18.5$  pg/mL;  $62.5$  [38.4–73.8] pg/mL vs. no:  $61.9 \pm 42.4$  pg/mL;  $55.0$  [34.0–75.4] pg/mL;  $p=0.728$ ), active mesalazine treatment (yes:  $61.3 \pm 40.5$  pg/mL;  $58.4$  [35.5–73.8] pg/mL vs. no:  $61.4 \pm 38.9$  pg/mL;  $55.0$  [38.0–77.6] pg/mL;  $p=0.821$ ), or active corticosteroid treatment (yes:  $60.3 \pm 43.1$  pg/mL;  $54.9$  [35.3–73.9] pg/mL vs. no:  $61.5 \pm 39.2$  pg/mL;  $58.2$  [35.5–74.5] pg/mL;  $p=0.760$ ).

## DISCUSSION

In this work, we found a significant difference in circulating alpha-CGRP levels in patients with a recent diagnosis of IBD compared to

TABLE 1 Main characteristics of IBD patients.

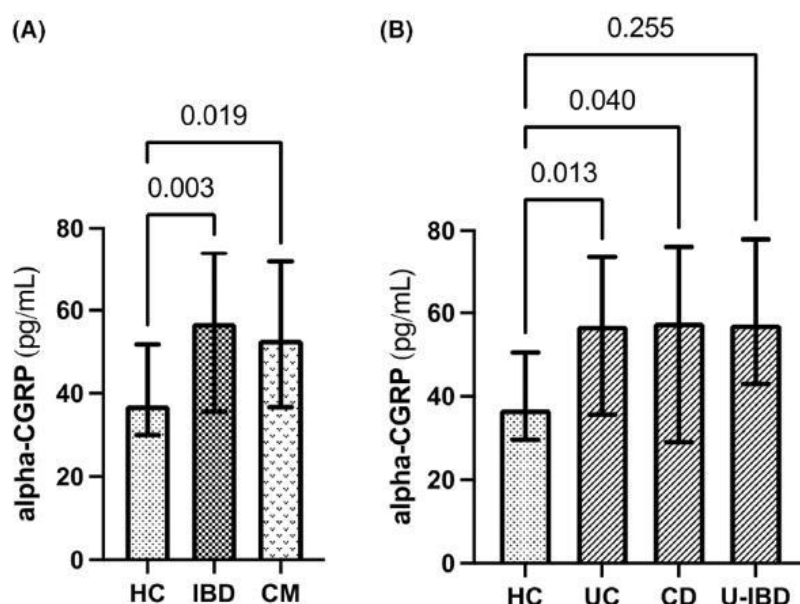
|                                         | Crohn's disease  | Ulcerative colitis | Unclassified IBD |
|-----------------------------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Total, <i>n</i>                         | 43               | 47                 | 6                |
| Sex, women (%)                          | 27 (62.8)        | 32 (68.1)          | 1 (16.7)         |
| Age, years                              | 50 ± 18 (21–82)  | 45 ± 18 (18–74)    | 45 ± 10 (27–56)  |
| Days from diagnosis to serum extraction | 757 ± 664, 0–250 | 87 ± 68 0–250      | 107 ± 69, 0–193  |
| Cardiovascular risk factors (%)         |                  |                    |                  |
| ≥1                                      | 26 (60.5)        | 13 (27.7)          | 5 (83.3)         |
| Active smoking                          | 17 (39.5)        | 5 (10.6)           | 2 (33.3)         |
| Arterial hypertension                   | 8 (18.6)         | 2 (4.3)            | 1 (16.7)         |
| Dyslipemia                              | 8 (18.6)         | 6 (12.8)           | 1 (16.7)         |
| Diabetes mellitus                       | 2 (4.6)          | 0                  | 1 (16.7)         |
| Body mass index, kg/m <sup>2</sup>      | 25.6 (17.2–40.1) | 23.5 (17.5–32.3)   | 26.5 (21.9–31.5) |
| BMI >30                                 | 5 (11.6)         | 2 (4.3)            | 2 (4.3)          |
| Immune disorders (%)                    |                  |                    |                  |
| ≥1                                      | 7 (16.3)         | 7 (12.8)           | 0                |
| Rheumatoid arthritis                    | 1 (2.3)          | 0                  |                  |
| Multiple sclerosis                      | 1 (2.3)          | 0                  |                  |
| Intrinsic asthma                        | 1 (2.3)          | 2 (4.3)            |                  |
| Spondylitis                             | 3 (7)            | 0                  |                  |
| Uveitis                                 | 1 (2.3)          | 0                  |                  |
| Celiac disease                          | 1 (2.3)          | 0                  |                  |
| Psoriasis                               | 0                | 2 (4.3)            |                  |
| Erythema nodosum                        | 0                | 1 (2.1)            |                  |
| Dermatitis herpetiformis                | 0                | 1 (2.1)            |                  |
| Urticaria-vasculitis                    | 0                | 1 (2.1)            |                  |
| Treatment (%)                           |                  |                    |                  |
| Any                                     | 30 (69.8)        | 36 (75.6)          | 6 (100)          |
| Mesalazine                              | 21 (48.8)        | 33 (70.2)          | 6 (100)          |
| Corticosteroids                         | 10 (23.3)        | 7 (14.9)           | 1 (16.7)         |
| Headache without migraine (%)           | 14 (32.6)        | 14 (29.8)          | 2 (33.3)         |
| Tension-type headache (%)               | 13 (30.2)        | 12 (25.5)          | 2 (33.3)         |
| Secondary headaches (%)                 | 1 (2.3)          | 2 (4.3)            |                  |
| Migraine, total (%)                     | 7 (16.3)         | 10 (21.3)          | 0                |
| Probable                                | 2 (4.6)          | 7 (14.9)           |                  |
| Definite                                | 5 (11.6)         | 3 (6.4)            |                  |
| ≥15 episodes a month                    | 2 (4.6)          | 1 (2.1)            |                  |

Abbreviations: BMI, body mass index; IBD, Inflammatory bowel disease.

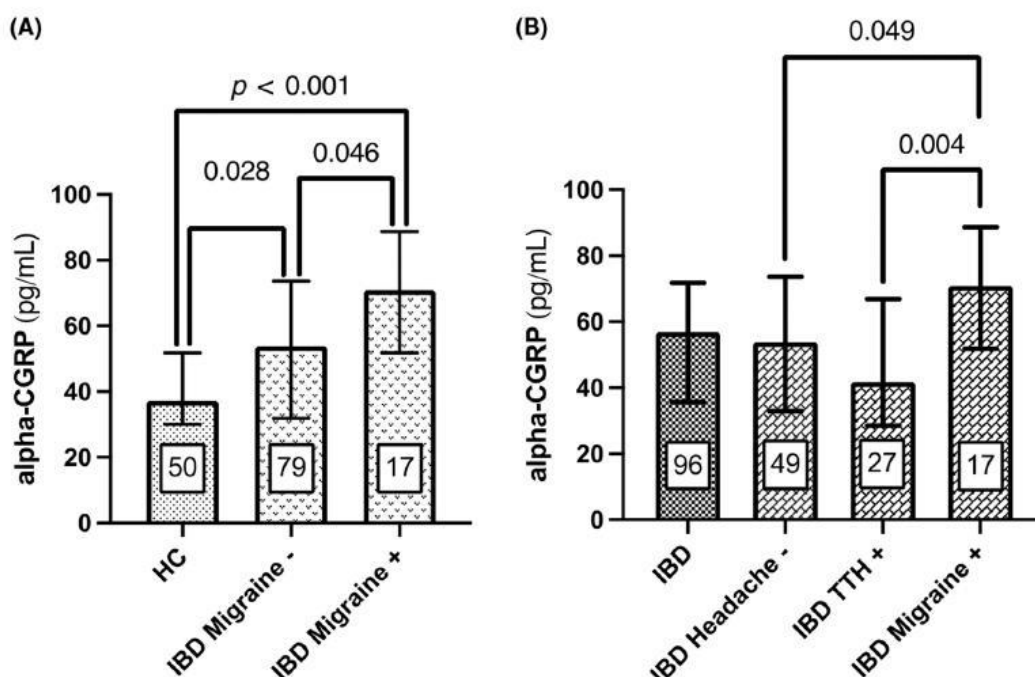
HC. The increase seen in patients with IBD was similar to that found here and in other works in CM<sup>2–5,11</sup> and was uniform for all diagnostic categories of IBD, including CD, UC, and U-IBD. To the best of our knowledge, this is the first study testing the levels of this neuropeptide in IBD and its varieties.

IBD is considered a chronic systemic inflammatory disease, and inflammation has also been proposed to play a role in migraine initiation and chronification via an increased expression of proinflammatory cytokines, including interleukins 1β, 6, and 8, and tumor necrosis factor alpha,<sup>37</sup> whose release is a known consequence of

the activation of the trigemino-vascular system, the final mechanism responsible for migraine pain. In fact, besides CM, a few studies have shown an increase in CGRP levels in other inflammatory conditions, both acute, as in COVID-19 disease,<sup>20,21</sup> or chronic, such as obesity.<sup>19</sup> As occurred in patients who had COVID-19 with pneumonia, serum alpha-CGRP levels were significantly higher in those patients with IBD who also met migraine criteria compared to HC, but also in those individuals who had headache, but did not fulfill migraine criteria.<sup>21</sup> These data show that circulating alpha-CGRP levels are not completely specific for migraine, as they can be increased in other



**FIGURE 3** Circulating levels of alpha-CGRP in: (A) HC, IBD, and CM patients. (B) HC and IBD patients classified by diagnostic categories. Comparisons are established using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test and *p* values are displayed on top of the lines connecting compared groups. All data are presented as median with interquartile range. CD, Crohn's disease; CGRP, calcitonin gene-related peptide; CM, chronic migraine; HC, healthy controls; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis; U-IBD, undefined inflammatory bowel disease.



**FIGURE 4** Circulating levels of alpha-CGRP in HC and IBD and its subgroups. (A) HC and IBD patients classified by presence of migraine. (B) IBD patients and classified by presence of migraine, presence of tension-type headache or absence of headache. Number of patients per group is displayed inside its corresponding box. Comparisons displayed are established using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test and *p* values are displayed on top of the lines connecting compared groups. All data are presented as median with interquartile range. CGRP, calcitonin gene-related peptide; HC, healthy controls; IBD, inflammatory bowel disease; IBD Headache -, inflammatory bowel disease patients without headache; IBD Migraine -, inflammatory bowel disease patients without migraine; IBD Migraine +, inflammatory bowel disease patients with migraine; IBD TTH +, inflammatory bowel disease patients with tension-type headache.

inflammatory conditions. Even so, the data reinforce the value of alpha-CGRP levels as a migraine biomarker, considering that patients who have IBD with migraine (and in particular those with IBD plus CM) showed the highest CGRP levels. In addition, our data concur

with the described comorbidity between migraine and IBD.<sup>22–26</sup> They are an example of the bidirectional relationship between the gastrointestinal and nervous systems known as the “gut-brain axis,” which has been involved, besides IBD, in the pathophysiology of

migraine and other comorbid gastrointestinal disorders, such as celiac disease, irritable bowel syndrome, or *Helicobacter* infection.<sup>38,39</sup> The mechanisms of how the brain and gut interact in patients with migraine are not entirely clear, but changes in the microbiota and/or in the biochemistry of neuronal innervation on the gastrointestinal tract could be implicated. Microbiota prevents systemic inflammation and plays a key role in nociception by preparing host adaptation to stress factors,<sup>40</sup> while the neuronal influence on the inflammatory status of the gastrointestinal tract is well demonstrated involving a variety of neurotransmitters,<sup>38</sup> such as serotonin, and of pain-producing neuropeptides, including CGRP. CGRP has been shown to exert a key role in both migraine and gut mucosa homeostasis: infusion of CGRP induces migraine pain and diarrhea<sup>41</sup> (the hallmark symptom of IBD), and the increase of alpha-CGRP shown here could explain some of the gastrointestinal manifestations also happening in patients with migraine. This increase in alpha-CGRP in IBD could also be interpreted as a protective, anti-inflammatory action on the gastrointestinal mucosa,<sup>42</sup> an aspect that should be taken into account and clinically analyzed when administering long-term CGRP antagonists to patients with migraine who also experience IBD.

One limitation of the study is the influence of concomitant IBD medication and activity. Three quarters of patients with IBD were using either corticosteroids or mesalazine, mainly initiated after the first clinical evaluation or endoscopic procedure due to clinical activity, and we were able to recruit only 28 patients with no treatment. Corticosteroids have been shown to decrease CGRP release.<sup>43</sup> Although we did not find significant differences between the subgroups with or without treatment, the number of patients does not allow us to draw definitive conclusions. However, the fact that we still found an increase in alpha-CGRP levels despite symptomatic anti-inflammatory treatment, which is able to decrease CGRP levels, supports our main finding that alpha-CGRP is increased in patients with IBD.

As the recruitment was carried out in specialized IBD and headache clinics, we cannot be absolutely sure of the external validity of our results. One further limitation here could be that we do not know with certainty to what extent the serum alpha-CGRP levels reflect the enteric or trigemino-vascular release of this peptide. At least in migraine, experimental data clearly indicate that circulating levels do reflect the release of alpha-CGRP by an activated trigemino-vascular system,<sup>44</sup> but there can be a contribution from neurons in the dorsal root ganglia supplying the vascular system (Figure 1).<sup>32</sup> This increase in circulating CGRP levels in migraine is selective for the alpha-CGRP as beta-CGRP have been shown to be within HC limits.<sup>11</sup> Strengths of the study include the high number of IBD cases included here; the fact that samples were obtained at the beginning of the disease, avoiding the potential influence of drugs and surgical procedures employed in IBD; and the use of an ELISA test that was alpha-CGRP specific.

## CONCLUSIONS

In summary, together with CM, circulating alpha-CGRP levels were higher in patients with IBD than in HC, perhaps reflecting the

chronic inflammation linked to IBD. Therefore, IBD is a further example that alpha-CGRP levels are not a totally specific biomarker for migraine. Alpha-CGRP levels were further increased in patients with IBD who had a concomitant history of migraine, which supports alpha-CGRP's role as a migraine biomarker in patients with headache who fulfill the criteria for migraine.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Marta Pascual-Mato:** Data curation; investigation; methodology; writing – original draft; writing – review and editing. **Gabriel Gárate:** Data curation; formal analysis; investigation; methodology; writing – original draft; writing – review and editing. **Vicente González-Quintanilla:** Data curation; writing – review and editing. **Jorge Madera-Fernández:** Data curation; writing – review and editing. **Beatriz Castro:** Data curation; writing – review and editing. **María José García:** Data curation; writing – review and editing. **Javier Crespo:** Conceptualization; writing – review and editing. **Montserrat Rivero:** Conceptualization; writing – review and editing. **Julio Pascual:** Conceptualization; data curation; formal analysis; funding acquisition; supervision; writing – original draft; writing – review and editing.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the nurse of our IBD Unit, María Soledad Serrano, for her continuous support.

## FUNDING INFORMATION

This study was funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project PI20/01358 and co-funded by Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER), "Una manera de hacer Europa."

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

**Marta Pascual-Mato, Gabriel Gárate, Vicente González-Quintanilla, Jorge Madera-Fernández, Beatriz Castro, María José García, Javier Crespo, Montserrat Rivero, and Julio Pascual** declare no conflicts of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data, laboratory methods, and study materials are available to other researchers upon reasonable request.

## ORCID

**Marta Pascual-Mato**  <https://orcid.org/0000-0002-6189-0612>

**Gabriel Gárate**  <https://orcid.org/0000-0003-1021-972X>

**Javier Crespo**  <https://orcid.org/0000-0001-8248-0172>

**Julio Pascual**  <https://orcid.org/0000-0002-3189-7573>

## REFERENCES

1. Pozo-Rosich P, Coppola G, Pascual J, Schwedt TJ. How does the brain change in chronic migraine? Developing disease biomarkers. *Cephalalgia*. 2021;41:613-630.
2. Rodríguez-Orsio X, Sobrino T, Brea D, Martínez F, Castillo J, Leira R. Endothelial progenitor cells: a new key for endothelial dysfunction in migraine. *Neurology*. 2012;79:474-479.

3. Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Cambor P, Pascual J. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology*. 2013;81:1191-1196.
4. Domínguez C, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, et al. CGRP and PTX3 as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine: an observational study. *Headache*. 2018;58:78-87.
5. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, et al. Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain*. 2000;86:133-136.
6. Alpuente A, Gallardo VJ, Asskour L, et al. Salivary CGRP can monitor the different migraine phases: CGRP (in)dependent attacks. *Cephalalgia*. 2022;42:186-196.
7. Kamm K, Straube A, Ruscheweyh R. Calcitonin gene-related peptide levels in tear fluid are elevated in migraine patients compared to healthy controls. *Cephalalgia*. 2019;39:1535-1543.
8. Van Dogen RM, Zielman R, Noga M, et al. Migraine biomarkers in cerebrospinal fluid: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia*. 2017;37:49-63.
9. Cernuda-Morollón E, Ramón C, Martínez-Cambor P, Serrano-Pertierra E, Larrosa D, Pascual J. OnabotulinumtoxinA decreases interictal CGRP plasma levels in patients with chronic migraine. *Pain*. 2015;156:820-824.
10. Alpuente A, Gallardo VJ, Asskour MLT, et al. Salivary CGRP and erenumab treatment response: towards precision medicine in migraine. *Ann Neurol*. 2022;92:846-859.
11. Gárate G, González-Quintanilla V, González A, et al. Serum alpha and beta-CGRP levels in chronic migraine patients before and after monoclonal antibodies against CGRP or its receptor. *Ann Neurol*. 2023;94:285-294.
12. Lee MJ, Lee SY, Cho S, Kang ES, Chung CS. Feasibility of serum CGRP measurement as a biomarker of chronic migraine: a critical reappraisal. *J Headache Pain*. 2018;19:53. doi:10.1186/s10194-018-0883-x
13. Gárate G, Pascual J. Comment on "plasma calcitonin gene-related peptide and nerve growth factor as headache and pain biomarkers in recently deployed soldiers with and without a recent concussion". *Headache*. 2024;64:119-120.
14. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Jansen-Olesen I, Olesen J. Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache. *Neurology*. 2000;55:1335-1340.
15. Frese A, Schilgen M, Edvinsson L, Frandsen E, Evers S. Calcitonin gene-related peptide in cervicogenic headache. *Cephalalgia*. 2005;25:700-703.
16. Tapia-Haro RM, Molina F, Rus A, Casas-Barragán A, Correa-Rodríguez M, Aguilar-Ferrández ME. Serum VEGF and CGRP biomarkers: relationships with pain intensity, electrical pain, pressure pain threshold, and clinical symptoms in fibromyalgia-an observational study. *Int J Mol Sci*. 2023;24:15533. doi:10.3390/ijms242115533
17. Soborg MLK, Jensen RH, Barloese M, Petersen AS. Biomarkers in cluster headache: a systematic review. *Headache*. 2023;64:98-116. doi:10.1111/head.14641
18. Gárate G, Pérez Pereda S, González-Quintanilla V, Madera J, Pascual J. Increase in CGRP levels in a case of hemicrania continua normalizes after successful response to galcanezumab. *Neurol Sci*. 2022;43:4581-4582.
19. Zelisen PMJ, Koppeschaar HPF, Lips CJM, Hackeng WHL. Calcitonin gene-related peptide in human obesity. *Peptides*. 1991;12:861-863.
20. Gárate G, Pascual M, Rivero M, et al. Serum calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  and  $\beta$  levels are increased in COVID-19 inpatients. *Arch Med Res*. 2023;54:56-63.
21. Gárate G, Toriello M, González-Quintanilla V, et al. Serum alpha-CGRP levels are increased in COVID-19 patients with headache indicating an activation of the trigeminal system. *BMC Neurol*. 2023;23:109. doi:10.1186/s12883-023-03156-z
22. Dimitrova AK, Ungaro RC, Lebowitz B, et al. Prevalence of migraine in patients with celiac disease and inflammatory bowel disease. *Headache*. 2013;53:344-355.
23. Cheraghi SC, Daryani NE, Ghabaee M. A survey of migraine prevalence in patients with inflammatory bowel disease-a single centre experience. *Middle East J Dig Dis*. 2016;8:282-288.
24. Moisset X, Bommelaer G, Boube M, et al. Migraine prevalence in inflammatory bowel disease patients: a tertiary-care centre cross-sectional study. *Eur J Pain*. 2017;21:1550-1560.
25. Liu Y, Xu F, Wheaton AG, Greenlund KJ, Thomas CW. The association between inflammatory bowel disease and migraine or severe headache among US adults: findings from the National Health Interview Survey, 2015-2016. *Headache*. 2021;61:612-616.
26. Pascual-Mato M, Gárate G, de Prado-Tejerina C, et al. Increased prevalence of migraine in women with inflammatory bowel disease: a cross-sectional study. *Cephalalgia*. 2024;44. doi:10.1177/03331024241233979
27. Chang JT. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *N Engl J Med*. 2020;383:2652-2664.
28. Populin L, Stebbing MJ, Furness JB. Neuronal regulation of the gut immune system and neuromodulation for treating inflammatory bowel disease. *FASEB BioAdvances*. 2021;3:953-966.
29. Bonaz R, Sinniger V, Pellissier S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol*. 2016;594:5781-5790.
30. Reinshagen M, Egger B, Procaccino F, Eysselein VE. Neuropeptides in inflammatory bowel disease: an update. *Inflamm Bowel Dis*. 1997;3:303-313.
31. Chen BN, Olsson C, Sharrad DF, Brookes SJH. Sensory innervation of the Guinea pig colon and rectum compared using retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28:1306-13016.
32. Engel MA, Becker C, Reeh PW, Neurath MF. Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence of a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1030-1033.
33. Holzer P, Holzer-Petsch U. Constipation caused by anti-calcitonin gene-related peptide migraine therapeutics explained by antagonism of calcitonin gene-related peptide's motor-stimulating and prosecretory function in the intestine. *Front Physiol*. 2022;12:820006. doi:10.3389/fphys.2021.820006
34. Tan LL, Bornstein JC, Anderson CR. Distinct chemical classes of medium-sized transient receptor potential channel vailloid1-immunoreactive dorsal root ganglion neurons innervate the adult mouse jejunum and colon. *Neuroscience*. 2008;156:334-343.
35. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal world congress of gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19(Suppl. A):5A-36A.
36. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018;38:1-211.
37. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K. Does inflammation have a role in migraine? *Nat Rev Neurol*. 2019;15:483-490.
38. Aurora SK, Shrewsbury SB, Ray S, Hindiyyeh N, Nguyen L. A link between gastrointestinal disorders and migraine: insights into the gut-brain connection. *Headache*. 2021;61:576-589.
39. Arzani M, Jahromi SR, Ghorbani Z, et al. Gut-brain axis and migraine headache: a comprehensive review. *J Headache Pain*. 2020;21:15. doi:10.1186/s10194-020-1078-9
40. He Q, Wang W, Xiong Y, et al. A causal effects of gut microbiota in the development of migraine. *J Headache Pain*. 2023;24:90. doi:10.1186/s10194-023-01609-x
41. Falkenberg K, Bjerg HR, Olesen J. Two-hour infusion causes gastrointestinal hyperactivity: possible relevance for CGRP antibody treatment. *Headache*. 2020;60:929-937.

42. Thompson BJ, Washington MK, Kurre U, Singh M, Rula EY, Emeson RB. Protective roles of alpha-calcitonin and beta-calcitonin gene-related peptide in spontaneous and experimentally induced colitis. *Dig Dis Sci*. 2008;53:229-241.
43. Neeb L, Hellen P, Hoffman J, Dirnagl U, Reuter U. Methylprednisolone blocks interleukin 1 beta induced calcitonin gene related peptide release in trigeminal ganglia cells. *J Headache Pain*. 2016;17:19. doi:[10.1186/s10194-016-0609-x](https://doi.org/10.1186/s10194-016-0609-x)
44. Hofmann J, Wecker S, Neeb L, et al. Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF. *Cephalalgia*. 2012;32:659-667.

**How to cite this article:** Pascual-Mato M, Gárate G, González-Quintanilla V, et al. Differences in circulating alpha-calcitonin gene-related peptide levels in inflammatory bowel disease and its relation to migraine comorbidity: A cross-sectional study. *Headache*. 2024;64:849-858. doi:[10.1111/head.14768](https://doi.org/10.1111/head.14768)



### **6.3 TERCERA PUBLICACIÓN**

Marta Pascual-Mato, Gabriel Gárate, Vicente González-Quintanilla, Beatriz Castro, María José García, Javier Crespo, Julio Pascual, Montserrat Rivero. (2024). Unravelling the role of beta-CGRP in inflammatory bowel disease and its potential role in gastrointestinal homeostasis. *BMC Gastroenterology*, 24(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12876-024-03366-w>

BMC Gastroenterology. IF:2.5; SJR: 65/164 (Q2); Gastroenterology.

Entrando ya en la tercera publicación, avanzamos en el papel del CGRP en la EII, estudiando la implicación de la isoforma específica del sistema nervioso entérico, beta-CGRP en estos pacientes.

RESEARCH

Open Access



# Unravelling the role of beta-CGRP in inflammatory bowel disease and its potential role in gastrointestinal homeostasis

Marta Pascual-Mato<sup>1</sup>, Gabriel Gárate<sup>2</sup>, Vicente González-Quintanilla<sup>2</sup>, Beatriz Castro<sup>1</sup>, María José García<sup>1</sup>, Javier Crespo<sup>1</sup>, Julio Pascual<sup>2\*</sup> and Montserrat Rivero<sup>1</sup>

## Abstract

**Background** The role of beta calcitonin gene-related peptide (beta-CGRP) in gastrointestinal tract is obscure, but experimental models suggest an effect on the homeostasis of the intestinal mucosa. We measured beta-CGRP circulating levels in a large series of subjects with a recent diagnosis of inflammatory bowel disease (IBD), in order to assess the potential role of this neuropeptide in IBD pathogenesis.

**Methods** Morning serum beta-CGRP levels were measured by ELISA (CUSABIO, China) in 96 patients recently diagnosed of IBD and compared with those belonging from 50 matched healthy controls (HC) and 50 chronic migraine (CM) patients.

**Results** Beta-CGRP levels were lower in patients with IBD ( $3.1 \pm 1.9$  pg/mL;  $2.9$  [2.4–3.4] pg/mL) as compared to HC ( $4.7 \pm 2.6$ ;  $4.9$  [4.0–5.8] pg/mL;  $p < 0.001$ ) and to CM patients ( $4.6 \pm 2.6$ ;  $4.7$  [3.3–6.2] pg/mL;  $p < 0.001$ ). Beta-CGRP levels in CM were not significantly different to those of HC ( $p = 0.92$ ). Regarding IBD diagnostic subtypes, beta-CGRP levels for ulcerative colitis ( $3.0 \pm 1.9$  pg/mL;  $2.5$  [2.1–3.4] pg/mL) and Crohn's disease ( $3.3 \pm 2.0$  pg/mL;  $3.2$  [2.4–3.9] pg/mL) were significantly lower to those of HC ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively) and CM ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively).

**Conclusions** We have found a significant reduction in serum beta-CGRP levels in patients with a recent diagnosis of all kinds of IBD as compared to two control groups without active intestinal disease, HC and CM, which may suggest a role for this neuropeptide in the pathophysiology of IBD. Our data indicate a protective role of beta-CGRP in the homeostasis of the alimentary tract.

**Keywords** Alpha-CGRP, Beta-CGRP, CGRP, Crohn's disease, Inflammatory bowel disease, Ulcerative colitis

\*Correspondence:

Julio Pascual

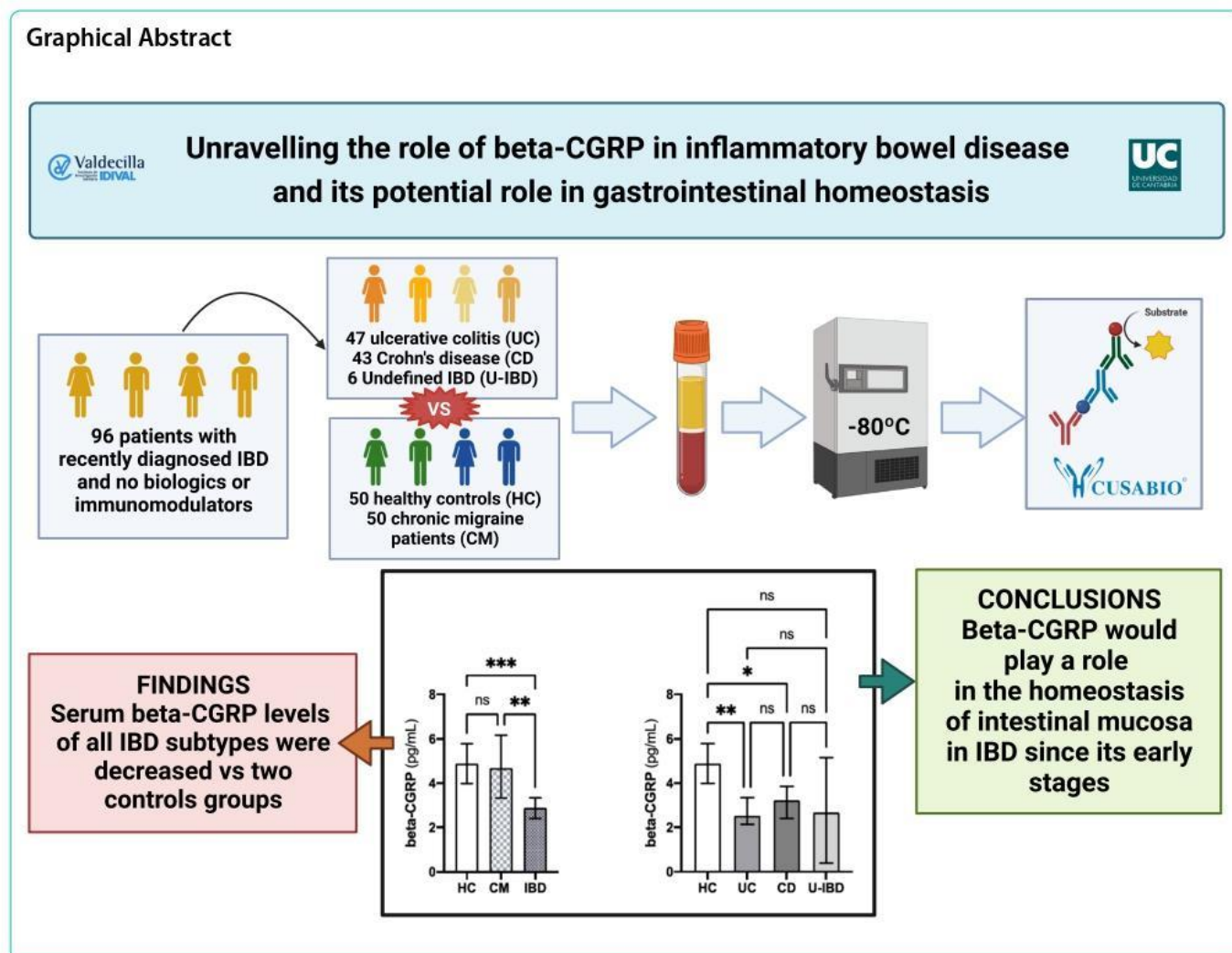
pascualj@unican.es

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

## Graphical Abstract

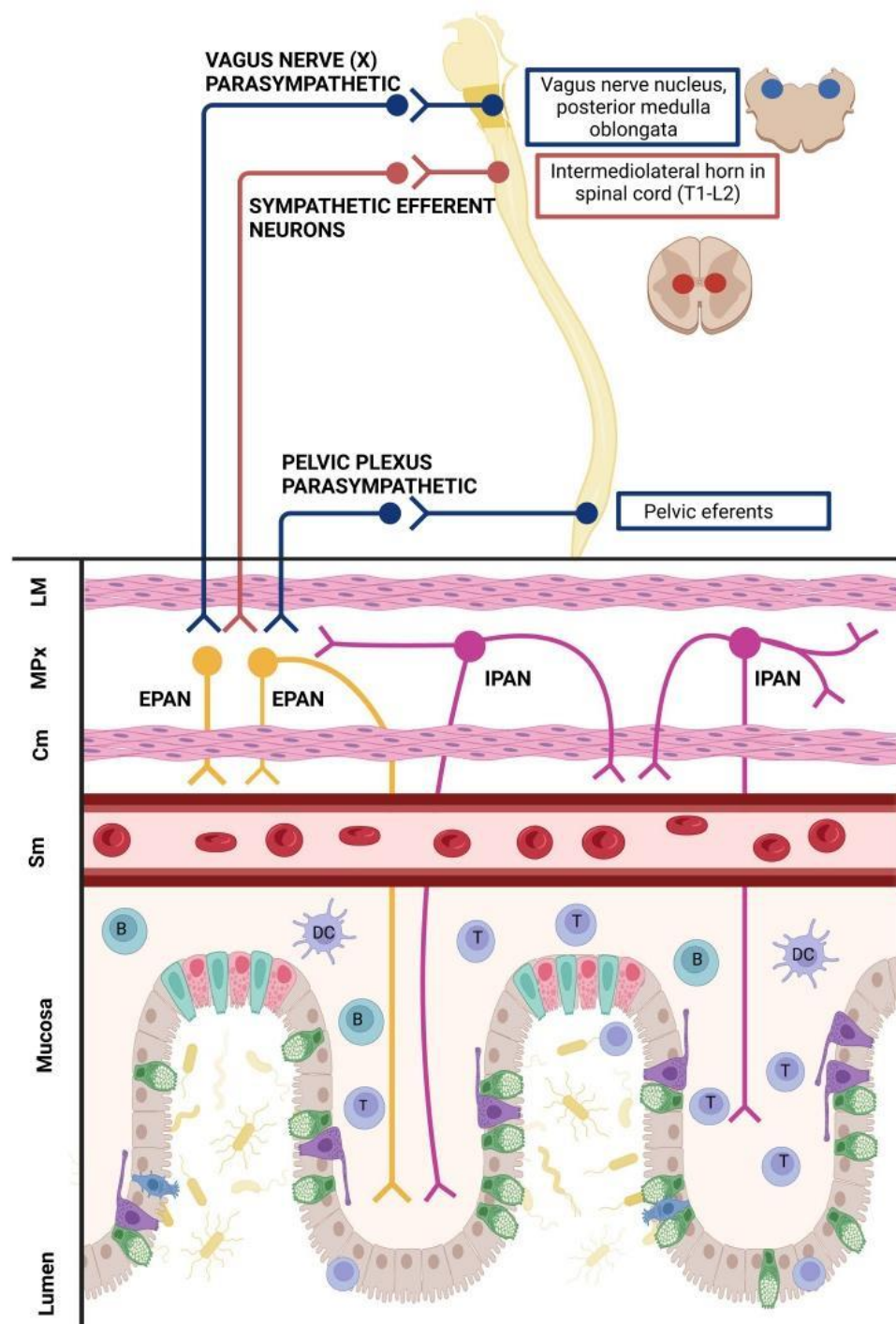


## Background

Inflammatory bowel disease (IBD), including mainly Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), involves chronic inflammation and disturbance of the gut immune system. In IBD the epithelial barrier is breached, which allows the entry of luminal microflora that stimulate a proinflammatory immune response. The mucosal injury, entry of luminal factors, dysbiosis and cytokine release overwhelms tissue protection and repair. The cause of IBD remains unknown and its pathogenesis is complex, encompassing genetic and epigenetic factors, microbiota and immunological abnormalities [1].

The neuronal influence on the inflammatory state of gastrointestinal tract in IBD is well demonstrated (Fig. 1) [2, 3]. In addition, gut immune cells express receptors for a range of neurotransmitters, including receptors for neuropeptides released by the intrinsic neurons of the nervous system, such as neurokinins, vasoactive intestinal peptide, neuromedin or

calcitonin gene-related peptide (CGRP) [4, 5]. CGRP is a 37 amino acid peptide discovered in 1982 with its gene located on chromosome 11 belonging to the calcitonin family, which is comprised by calcitonin, amylin, adrenomedullin, adrenomedullin 2/intermedin and CGRP [6–8]. CGRP has two isoforms (alpha and beta), which differ by only three amino acids. However, they are encoded by different genes and their location is different [9, 10]. While alpha-CGRP is expressed in areas of the central nervous system (dorsal root, autonomic and trigeminal ganglia and primary sensory neurons), which explains its key role in migraine pathophysiology [11, 12], beta-CGRP is mainly found within myenteric neurons in the small bowel and colon [13–15]. The role of beta-CGRP in gastrointestinal tract is obscure, but experimental data would suggest a protective effect on intestinal mucosa and therefore a role in the pathophysiology of diseases such as IBD or diverticulitis [16, 17]. Therefore, we measured beta-CGRP serum levels in a series of subjects with a recent diagnosis of IBD.



**Fig. 1** Gastro-intestinal tract innervation with emphasis on efferent neuronal pathways involved in CGRP release. Alpha-CGRP is liberated by EPANs, which are modulated by sympathetic and parasympathetic system. Beta-CGRP is released by Dogiel type II neurons or IPAN. B, B lymphocytes; T, T lymphocytes; DC, dendritic cell. Created with BioRender.com

## Methods

### Study design and selection of study participants

Consecutive subjects with a recent diagnosis of IBD and classified according to the Montreal Classification [18] were recruited from our IBD Unit from January 2021 to March 2023. To be included, IBD patients had to be > 17

years and have a new, recent (< 1 year) IBD diagnosis. Patients on biologics or immunosuppressants were excluded. We allowed only treatment with mesalazine or steroids. We registered autoimmune comorbidities and/or extraintestinal manifestations, and cardiovascular risk factors. We considered as a significant cardiovascular risk

factor the presence of active smoking, arterial hypertension, dyslipemia, diabetes mellitus and body mass index (BMI)  $> 30 \text{ kg/m}^2$ .

We included two control populations with similar age and sex. As healthy controls (HC), volunteers with no history of active medical or psychiatric disease, with absence of gastrointestinal or headache symptoms and taking no medication. The second control group was composed by patients who met current chronic migraine (CM) criteria attending our Headache Unit [19]. We included a group of CM patients as this is the disease for which the value of CGRP as a biomarker has been well-established and as gastrointestinal symptoms are a part of the migraine clinical spectrum. CM patients were not on any anti-CGRP treatment and had not taken acute antimigraine treatment for the previous 24 h to blood extraction. Recruiting process was performed simultaneously for the three groups.

### Sample size and data collection

Based on our data from previous studies measuring beta-CGRP in patients with diarrhea due to COVID-19 and HC and in CM patients [20, 21], we calculated that with an expected change of 33% between the IBD and the HC groups, alpha equal to 0.05 and a power of 80%, we had to include a minimum of 47 subjects per group.

Detailed clinical data were available for all the participants. The study received IRB approval by the Ethics Committee of Cantabria (28/2020). All participants gave written informed consent.

### Laboratory testing

Blood samples were extracted in our outpatient clinic in fasting condition between 9 and 12 am. The blood was left to clot for 10 min prior to the centrifugation, at 3500 rpm and 4°C for another 10 min. The obtained serum was then immediately transferred into sterile tubes and stored at -80°C. All samples were frozen within the first 30 min since extraction and all were assayed before reaching 6 months of cryopreservation.

For the determination of beta-CGRP levels we employed a commercially available ELISA kit specifically designed for the detection of this isoform (CUSABIO, China) as described previously [20, 21]. We proceed by strictly following the manufacturer's instructions. For last step of the ELISA process, in which the user must determine the optimal time for incubation of the plate with the substrate from a given window by the manufacturers, we carried out incubations of 20 min after internal validation. All samples were measured in duplicate, and all measurements had an intra-assay coefficient of variation below 8%, therefor meeting the quality criteria set by manufacturers. A standard curve was generated for every

single bath, and these were calculated using a 4-parameter logistic (4-PL) regression with  $r^2 > 0.999$ . For ensuring the reproducibility of results, every batch included at least 10 samples from the HC group assayed in previous plates, obtaining an inter-assay variability  $< 10\%$ , also below the threshold set by the manufacturer for this criterium.

### Statistical analysis

Categorical variables are reported as percentages, whereas continuous variables are displayed as mean  $\pm$  SD for normally distributed data and together with median (with 95% confidence interval [CI] of median) for non-normally distributed data unless stated differently in the text. For normality testing of quantitative variables we carried out the D'Agostino & Pearson test ( $p < 0.05$  to refuse  $H_0$ ). To assess the statistical differences between groups of continuous variables following normal distribution (age) we employed the student's  $t$  test. For non-normally distributed data (beta-CGRP), Mann-Whitney U test was carried out. For group comparison of categorical variables, the chosen prove was the Fisher's exact test. For multiple group comparisons of sub-groups created upon post-hoc division, we performed Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. The evaluation of correlation relationships was done by Pearson's test.

The  $p$  values presented are for two-tailed testing, and we considered a  $p < 0.05$  to prove statistical significance. All analyses were performed using GraphPad Prism version 9.4.1 (GraphPad Software).

## Results

### Baseline characteristics of study participants

We included 96 IBD cases (age  $47.8 \pm 16.5$  years, range 18–82 years; 62.5% women); 50 HC (age  $47.9 \pm 16.3$  years, range 23–77 years; 62.5% women) and 50 CM patients (age  $47.9 \pm 12.0$  years, range 21–69 years; 76% women). Among IBD subjects, 47 (49.0%) met diagnostic criteria of UC, 43 (44.8%) of CD and 6 (6.2%) of unclassified IBD (U-IBD). The mean time from diagnosis to blood extraction was  $74.9 \pm 64.5$  days (median 55.5 days; range between 0–250 days). Regarding treatments, 75% of patients were with either steroids, mesalazine or a combination of the two of them. Fourteen patients (14.6%) had at least one associated autoimmune disorder or extraintestinal manifestation of IBD. 45 patients (46.9%) had one vascular risk factor (Table 1).

### Beta-CGRP levels

Beta-CGRP circulating levels were lower in patients with IBD (mean  $\pm$  SD  $3.1 \pm 1.9$  pg/mL; median [range] 2.9 [2.4–3.4] pg/mL) as compared to HC ( $4.7 \pm 2.6$ ; 4.9 [4.0–5.8] pg/mL;  $p < 0.001$ ) and to CM patients

**Table 1** Main characteristics of IBD patients

|                                                  | Crohn's disease                                                                                                                               | Ulcerative colitis                             | Unclassified-IBD      |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|
| Total, n                                         | 43                                                                                                                                            | 47                                             | 6                     |
| Sex, women                                       | 26 (60.5)                                                                                                                                     | 32 (68.1)                                      | 1 (16.7)              |
| Age, y                                           | 51.25 ± 15.19, (22-82)                                                                                                                        | 45.3 ± 18.05, (18-74)                          | 44.5 ± 10.62, (27-56) |
| Days from diagnosis to serum extraction          | 56.9 ± 56.5, 0-213                                                                                                                            | 87.2 ± 67.5, 0-250                             | 106.6 ± 69.2, 0-193   |
| Disease distribution (Montreal's classification) | A2: 14 (32.6)<br>A3: 29 (67.4)<br>L1: 24 (55.8)<br>L2: 8 (18.6)<br>L3: 8 (18.6)<br>L4: 3 (7.0)<br>B1: 38 (88.4)<br>B2: 3 (7.0)<br>B3: 2 (4.7) | E1: 24 (51.1)<br>E2: 16 (34.0)<br>E3: 7 (14.9) |                       |
| Perianal disease                                 | 5 (11.6)                                                                                                                                      | 1 (2.1)                                        | 0                     |
| Cardiovascular risk factors,<br>≥ 1              | 27 (62.8)                                                                                                                                     | 13 (27.7)                                      | 5 (83.3)              |
| Active smoking                                   | 18 (41.86)                                                                                                                                    | 5 (10.6)                                       | 2 (33.3)              |
| Arterial hypertension                            | 8 (18.6)                                                                                                                                      | 2 (4.3)                                        | 1 (16.7)              |
| Dyslipemia                                       | 8 (18.6)                                                                                                                                      | 6 (12.8)                                       | 1 (16.7)              |
| Diabetes mellitus                                | 2 (4.7)                                                                                                                                       | 0                                              | 1 (16.7)              |
| Body mass index, kg/m <sup>2</sup>               | 25.3 (17.2–40.1)                                                                                                                              | 23.5 (17.5–32.3)                               | 26.5 (21.9–31.5)      |
| BMI > 30                                         | 5 (9.3)                                                                                                                                       | 2 (4.3)                                        | 2 (4.3)               |
| Immune disorders<br>≥ 1                          | 7 (16.3)                                                                                                                                      | 7 (12.8)                                       | 0                     |
| Rheumatoid arthritis                             | 1 (2.3)                                                                                                                                       | 0                                              | 0                     |
| Multiple sclerosis                               | 1 (2.3)                                                                                                                                       | 0                                              | 0                     |
| Asthma                                           | 1 (2.3)                                                                                                                                       | 2 (4.3)                                        | 0                     |
| Spondylitis                                      | 3 (7)                                                                                                                                         | 0                                              | 0                     |
| Uveitis                                          | 1 (2.3)                                                                                                                                       | 0                                              | 0                     |
| Coeliac disease                                  | 1 (2.3)                                                                                                                                       | 0                                              | 0                     |
| Psoriasis                                        | 0                                                                                                                                             | 2 (4.3)                                        | 0                     |
| Erythema nodosum                                 | 0                                                                                                                                             | 1 (2.1)                                        | 0                     |
| Dermatitis herpetiformis                         | 0                                                                                                                                             | 1 (2.1)                                        | 0                     |
| Urticaria-vasculitis                             | 0                                                                                                                                             | 1 (2.1)                                        | 0                     |
| Treatment                                        |                                                                                                                                               |                                                |                       |
| Any                                              | 31 (72.1)                                                                                                                                     | 36 (75.6)                                      | 5 (83.3)              |
| Mesalazine                                       | 21 (48.8)                                                                                                                                     | 33 (70.2)                                      | 5 (83.3)              |
| Steroids                                         | 11 (25.6%)                                                                                                                                    | 7 (14.9)                                       | 1 (16.7)              |
| <b>Other comorbidities</b>                       |                                                                                                                                               |                                                |                       |
| Hypothyroidism                                   | 5 (11.5)                                                                                                                                      | 2 (4.3)                                        | 0                     |
| Chronic pancreatitis                             | 1 (2.3)                                                                                                                                       | 0                                              | 0                     |

BMI body mass index

Values are reported as number (percentage), means ± SD (range), or mean (range)

(4.6 ± 2.6; 4.7 [3.3–6.2] pg/mL;  $p < 0.001$ ). Beta-CGRP levels in CM were not significantly different to those of HC ( $p = 0.92$ ). Regarding IBD subtypes, beta-CGRP levels for UC (3.0 ± 1.9 pg/mL; 2.5 [2.1–3.4] pg/mL) and CD (3.3 ± 2.0 pg/mL; 3.2 [2.4–3.9] pg/mL) were significantly

lower to those of HC ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively, while beta-CGRP for U-IBD remained numerically lower (3.0 ± 1.8 pg/mL, 2.7 [0.4–5.2] pg/mL). When compared to CM, beta-CGRP content in UC and CD patients remained significantly lower ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$

respectively) but not U-IBD patients, although the comparison showed a numerical decrease (Fig. 2).

#### Influence of clinical factors in beta-CGRP levels

No significant differences arose when patients were classified by presence/absence of cardiovascular risk factors (yes:  $3.1 \pm 1.7$  pg/mL; no:  $3.2 \pm 2.1$  pg/mL;  $p=0.93$ ); autoimmune comorbidities (yes:  $3.4 \pm 1.4$  pg/mL; no:  $3.1 \pm 2.0$  pg/mL;  $p=0.24$ ); active mesalazine treatment (yes:  $3.1 \pm 1.9$  pg/mL; no:  $3.2 \pm 1.9$  pg/mL;  $p=0.91$ ); or active steroid treatment (yes:  $3.0 \pm 1.9$  pg/mL; no:  $3.2 \pm 1.9$  pg/mL;  $p=0.52$ ).

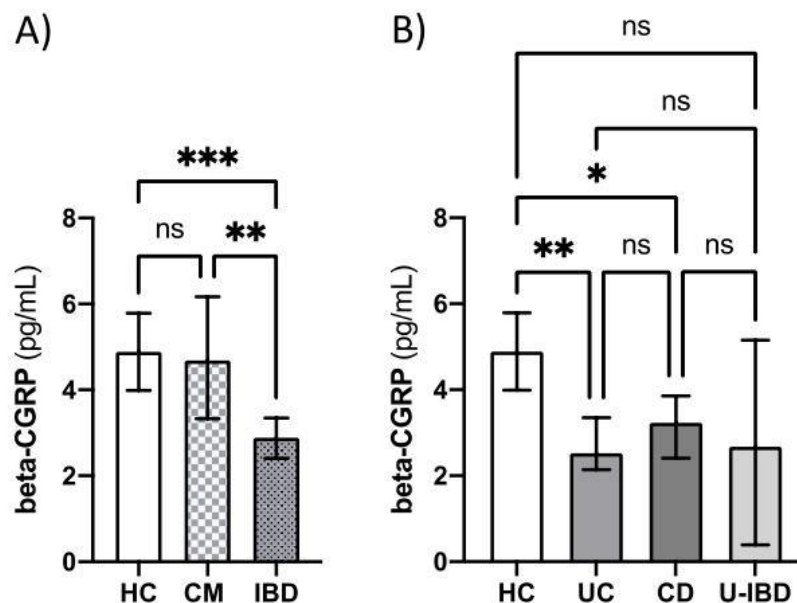
#### Discussion

We have found a significant reduction in serum beta-CGRP levels in patients with a recent diagnosis of IBD versus two control groups without intestinal disease, HC and CM. The decrease in beta-CGRP levels was uniform for the three kinds of IBD: CD, UC and U-IBD. To our knowledge, this is the first study analyzing specifically beta-CGRP levels in IBD patients.

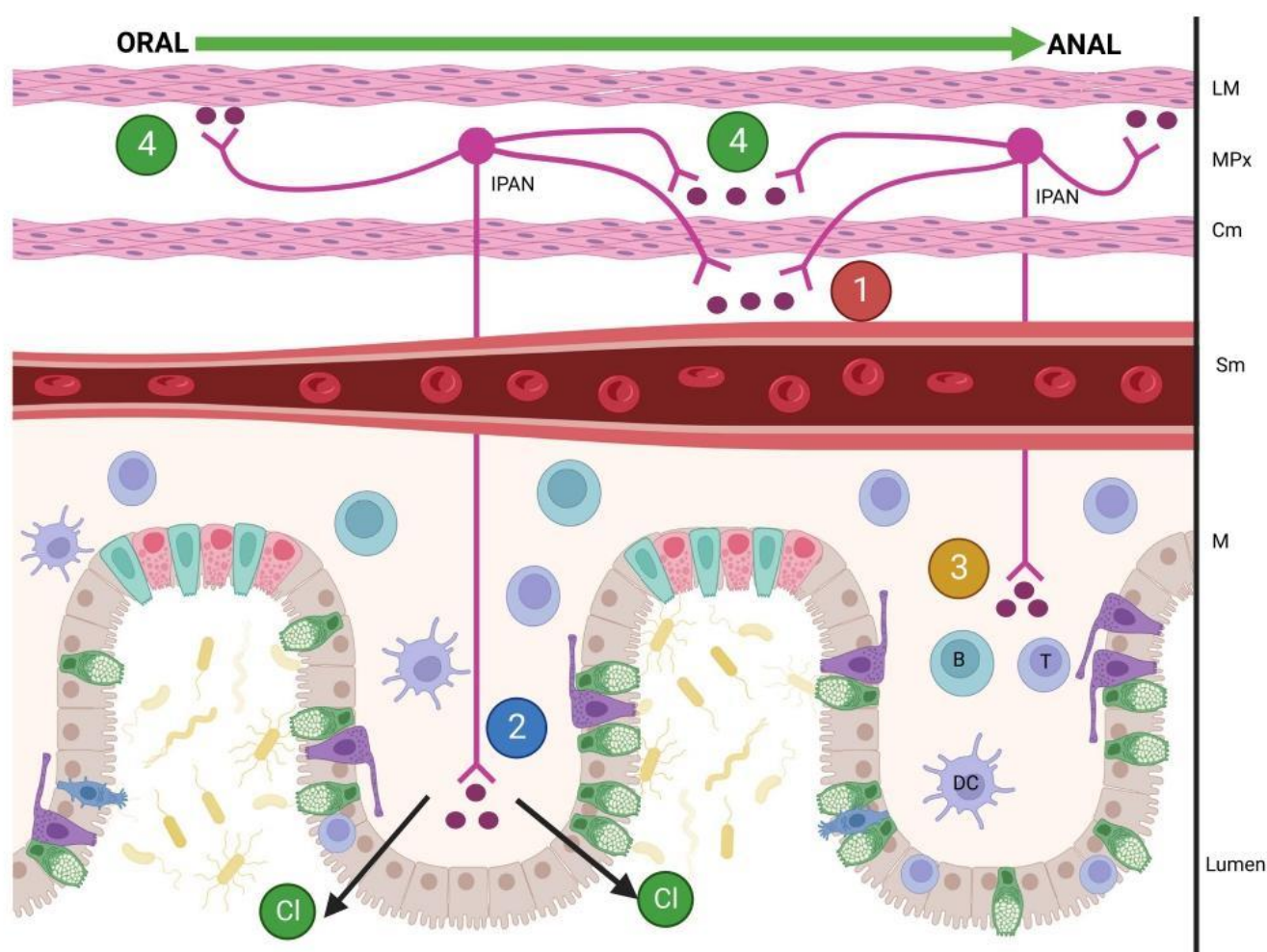
Beta-CGRP has a predominant gut location and its concentration in the intestine is seven times higher than that of alpha-CGRP; therefore, though most studies do not differentiate between alpha and beta isoforms, it can be assumed that data about gut CGRP are mostly referring to beta-CGRP [13–15]. CGRP has been shown to be anti-inflammatory in many tissues [22], including the gut [23–25]. In experimental models, CGRP knockout mice are more susceptible to develop colitis and spontaneous

lymphoid hyperplasia [26], which might indicate a protective role in bowel inflammation. Concurring with our data, Li et al. found that CGRP and CGRP mRNA expression were decreased in the intestinal mucosa of UC patients. As the magnitude of this decrease correlated with the severity of IBD, they proposed CGRP as a UC biomarker [27]. We show here that beta-CGRP levels are decreased already in many patients on their first stages of the disease, which suggests that this reduction is not secondary to an established chronic damage of the mucosa, but that could have a key role in the maintenance of wall homeostasis in the initial IBD stages.

Considering all these data, it is tempting to propose a protective role of beta-CGRP in keeping gastrointestinal homeostasis in IBD. In the enteric nervous system, beta-CGRP is expressed in a subset of Dogiel type II, intrinsic primary afferent neurons, while alpha-CGRP is expressed in the afferent neurons of the extrinsic nervous system originating from the dorsal root and vagal ganglia [14, 28, 29]. CGRP has been shown to serve as a protective factor in experimental models of colitis, such as those induced by trinitrobenzenesulfonic acid or dextran sulfate sodium [16, 30, 31]. Although the mechanisms underlying this mucosal protection are largely unknown, there are multiple ways by which beta-CGRP might manifest its effects (Fig. 3). CGRP is a potent vasodilator and mediator of localized blood flow [32], which could minimize damage by promoting tissue repair. CGRP liberation increases colon chloride secretion [33], which would aid in the clearance of toxics agents. Experimentally induced colitis



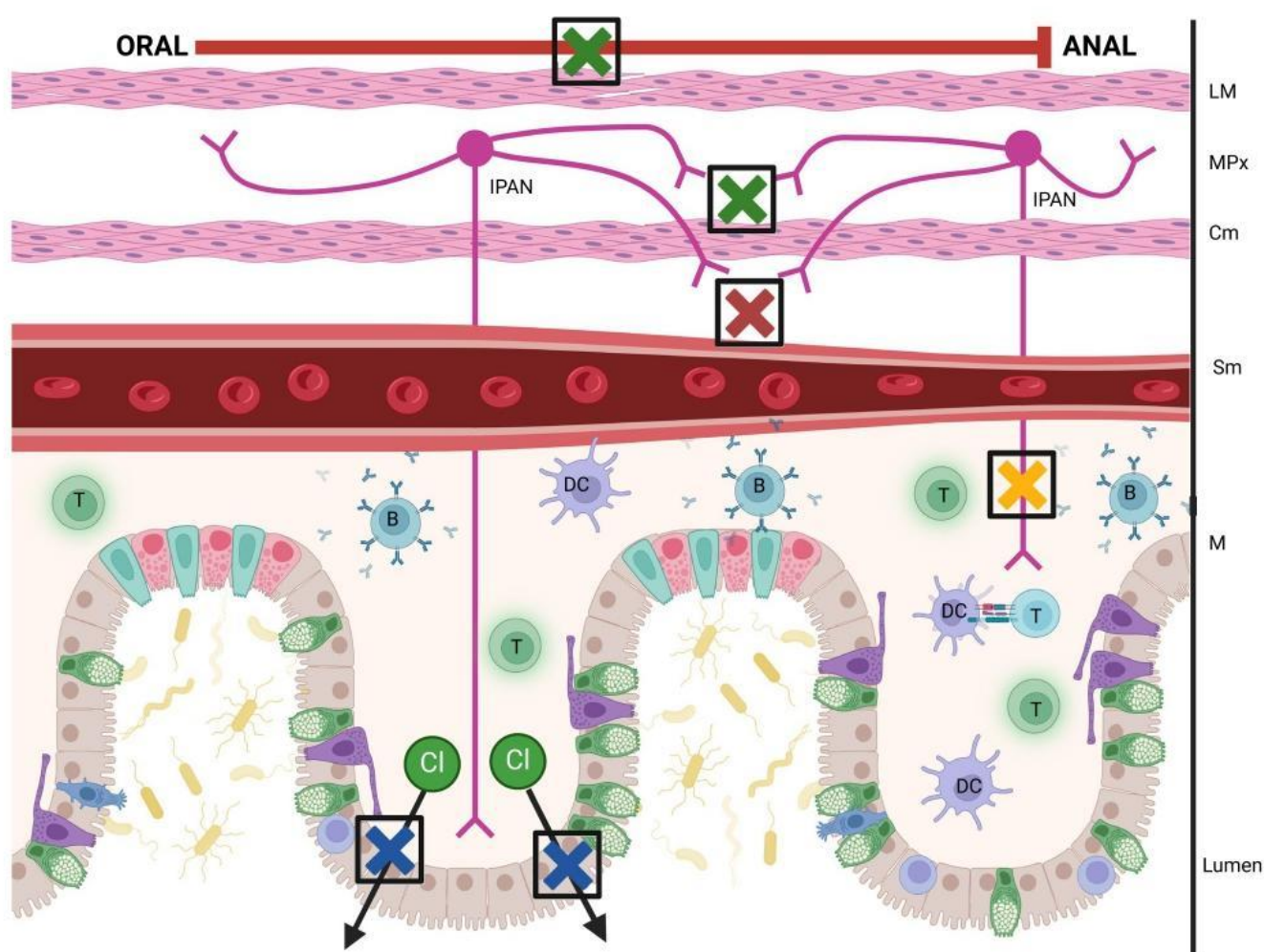
**Fig. 2** Serum beta-CGRP levels in IBD vs HC and CM patients (median; 95% CI). **A** Significant decrease in IBD patients as compared to HC and CM subjects. **B** This decrease in beta-CGRP levels versus HC is uniform in UC, CD and U-IBD. ns:  $p > 0.05$ ; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . HC, healthy controls; CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; U-IBD, unclassified inflammatory intestinal disease



**Fig. 3** Proposed physiology of beta-CGRP. Beta-CGRP (violet circles) is released by intrinsic primary afferent neurons (IPAN), located in the myenteric plexus. Four main functions have been associated with beta-CGRP secretion: 1) vasodilation of enteric blood vessels; 2) secretion of chloride in the enteric cells; 3) regulation of proliferation and activation of lymphocytes and dendritic cells; and 4) activation of gut muscle and oral/anal propulsion. Cl, chloride; Cm, circular muscle layer; LM, longitudinal muscle layer; M, mucosa; MPx, myenteric plexus; Sm, submucosal layer. Created with BioRender.com

results in cytokine profiles characteristic of T-helper cells mediated responses [34]. Although neither T nor B cells are required for the induction of experimental colitis [35], it is possible that lymphocytes are involved in propagation of the inflammatory response [21]. Beta-CGRP has been shown to be synthesized and secreted not only by intrinsic enteric neurons but also by T lymphocytes [36]. Such secretion is able to inhibit lymphocyte proliferation, thereby providing a further possible mechanism by which beta-CGRP could act globally to limit the inflammatory process. Interestingly, further supporting a role for enteric CGRP in dysregulation of lymphocytes proliferation, CGRP inhibits interleukin-7 response of B cells through interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha mediated pathways and CGRP-null mice both spontaneously develop colitis and significant colon lymphoid hyperplasia with aging [37, 38]. All these data support a

protective role of CGRP, and specifically of beta-CGRP, against gastrointestinal mucosal damage. There are other examples of this potential protective role of CGRP. In the stomach, CGRP reverts acid-mediated healing by stimulating somatostatin and gastrin release from the antral cells [39]. CGRP levels are decreased in the enteric ganglia of patients with diverticular disease, which again suggests a role for CGRP in colonic homeostasis [22]. CGRP is involved in a variety of physiological processes throughout the alimentary tract, such as nociception, immune response, secretion and motility [40, 41]. CGRP is also a potent smooth muscle relaxant [42–44]; declined levels could induce an increase in smooth muscle tone and, as already pointed out, play a role in diverticular disease progression [17], but also contribute to some of the IBD motility-dependent symptoms (Fig. 4).



**Fig. 4** Beta-CGRP reduction in IBD would induce four distinct changes, marked in this figure with different crosses: 1) red: vasoconstriction of submucosal blood vessels; 2) blue: inhibition of secretion of chloride in enteric cells, which can cause damage in the mucosal layer; 3) yellow: lymphocyte proliferation and activation, as well as cytokine release; and 4) green: inhibition of oral/anal propulsion. Cl, chloride; Cm, circular muscle layer; LM, longitudinal muscle layer; M, mucosa; MPx, myenteric plexus; Sm, submucosal layer. Created with BioRender.com

Our main limitation could be that we do not know with certainty to what extent the serum beta-CGRP reflects the enteric levels. The same happens for the alpha-CGRP isoform whose release by the cranial trigemino-vascular system plays a key role in migraine pathophysiology [11, 12]. Thinking that circulating CGRP values would be of value only if the samples were obtained locally, the first studies showing increased alpha-CGRP levels were carried out in the jugular vein ipsilateral to the pain [45]. However, subsequent studies have shown that this increase in alpha-CGRP is seen acutely within migraine attacks [45, 46], and also interictally in CM cases in cubital samples [21, 47]. Furthermore, experimental data clearly indicate that circulating levels do reflect the release of alpha-CGRP in by an activated trigemino-vascular system [48]. This increase in circulating CGRP levels in migraine is selective for the alpha-CGRP as beta-CGRP have been shown to be within HC limits [21].

One further limitation is that the ability to infer causality between low beta-CGRP levels and IBD pathogenesis is limited since our study is cross-sectional. In fact, to test a potential pathophysiological role of beta-CGRP in IBD it would be necessary to perform an intervention study, for example, to use beta-CGRP or its agonist during the induction of experimental IBD. One important point to consider here is the chameleonic behavior of circulating beta-CGRP levels: serum beta-CGRP levels are reduced here in patients with a chronic condition as IBD, but increase, for instance, in patients with diarrhea due to a COVID-19 infection [49], where a generalized neuropeptide release secondary to the cytokine storm occurs [20]. The high number of IBD cases included here, the fact that samples were obtained at the beginning of the disease -avoiding the potential influence of drugs and surgical procedures employed in IBD- and the use of an ELISA test beta-CGRP specific could be considered as strengths.

Finally, though we included only IBD patient with a recent diagnosis, there were 5 CD patients who were on B2/B3 stages and also 5 who had perianal disease, which could not be regarded as the first or initial changes of the disease. Therefore, reduced beta-CGRP levels could also be explained by an established damage of the intestinal mucosa.

## Conclusion

In summary, circulating beta-CGRP levels were shown to be clearly reduced in patients with IBD, which supports its role in IBD pathophysiology since its early stages. Our data may indicate a protective role of beta-CGRP in alimentary tract homeostasis. Future studies are necessary to verify its value as an IBD biomarker; we find particularly interesting to test the relationship between beta-CGRP and disease activity. Finally, our results have translational implications: specific beta-CGRP agonists should be developed and tested in IBD and other digestive diseases and teach us that we have to pay especial attention to the course of IBD in patients who are using the new CGRP antagonists for the treatment of headache conditions.

## Abbreviations

|       |                                         |
|-------|-----------------------------------------|
| BMI   | Body mass index                         |
| CD    | Crohn's disease                         |
| CGRP  | Calcitonin-gene related peptide         |
| CI    | Confidence interval                     |
| Cl    | Chloride                                |
| CM    | Chronic migraine                        |
| Cm    | Circular muscle layer                   |
| DC    | Dendritic cell                          |
| EPAN  | Extrinsic primary afferent neuron       |
| HC    | Healthy controls                        |
| IBD   | Inflammatory bowel disease              |
| IPAN  | Intrinsic primary afferent neurons      |
| LM    | Longitudinal muscle layer               |
| M     | Mucosa                                  |
| MPx   | Myenteric plexus                        |
| SD    | Standard deviation                      |
| Sm    | Submucosal layer                        |
| U-IBD | Unclassified inflammatory bowel disease |
| UC    | Ulcerative colitis                      |

## Acknowledgements

We are grateful to the nurse of our IBD Unit María Soledad Serrano for her continuous support.

## Authors' contributions

Study concept and design (J.P., J.C. and M.R.); data acquisition and analysis (M.P.M., G.G., V.G.Q., C.P.T., M.J.G., B.C. and J.M.); laboratory procedures (G.G.); drafting of the manuscript (M.P.P., J.P. and G.G.). All authors reviewed the manuscript.

## Funding

This study has been founded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the project PI20/01358 and co-funded by Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER), "Una manera de hacer Europa".

## Availability of data and materials

The data, laboratory methods and study materials are available to other researchers upon reasonable request to the correspondence author.

## Data availability

No datasets were generated or analysed during the current study.

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Informed consent was obtained from all participants. All procedures involving human participants adhered to the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the Helsinki Declaration. The ethics research committee of Cantabria, Spain approved this study's protocol.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Gastroenterology and Hepatology Department, Clinical and Translational Research in Digestive Diseases, Valdecilla Research Institute (IDIVAL), University Hospital Marqués de Valdecilla and Universidad de Cantabria, Santander, Spain. <sup>2</sup>Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria and IDIVAL, Av. Valdecilla s/n, Santander 39008, Spain.

Received: 14 December 2023 Accepted: 9 August 2024

Published online: 13 August 2024

## References

- Chang JT. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *N Engl J Med*. 2020;383:2652–64.
- Populin L, Stebbing MJ, Fumess JB. Neuronal regulation of the gut immune system and neuromodulation for treating inflammatory bowel disease. *FASEB Bioadv*. 2021;3:953–66.
- Bonaz R, Sinniger V, Pellissier S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol*. 2016;594:5781–90.
- Reinshagen M, Egger B, Procaccino F, et al. Neuropeptides in inflammatory bowel disease: an update. *Inflamm Bowel Dis*. 1997;3:303–313.
- Engel MA, Becker C, Reeh PW, et al. Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence of a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1030–3.
- Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, et al. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNA encoding different polypeptide products. *Nature*. 1982;298:240–4.
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*. 1983;304:129–35.
- Poyner DR, Sexton PM, Marshall I. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54:233–46.
- Steenbergh PH, Höppener JW, Zandberg J, et al. A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Lett*. 1985;183:403–7.
- Höppener JW, Steenbergh PH, Zandberg J, et al. The second human calcitonin/CGRP gene is located on chromosome 11. *Hum Genet*. 1985;70:259–63.
- Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K, et al. CGRP as the target of new migraine therapies—successful translation from bench to clinic. *Nat Rev Neurol*. 2018;14:338–350.
- Russo AF, Hay DL. CGRP physiology, pharmacology, and therapeutic targets: migraine and beyond. *Physiol Rev*. 2023;103:1565–644.
- Schütz B, Mauer D, Salmon AM, et al. Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice. *J Comp Neurol*. 2004;476:32–43.
- Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, et al. Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience*. 1988;25:195–205.

15. van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and function of CGRP-related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21:649–78.
16. Thompson BJ, Washington MK, Kurre U, et al. Protective roles of alpha-calcitonin and beta-calcitonin gene-related peptide in spontaneous and experimentally induced colitis. *Dig Dis Sci*. 2008;53:229–41.
17. Pauza AG, Rysevaite-Kyguoliene K, Malinauskas M, et al. Alterations in enteric calcitonin gene-related peptide in patients with colonic diverticular disease: CGRP in diverticular disease. *Auton Neurosci*. 2019;216:63–71.
18. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19(Suppl. A):5A–36A.
19. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018;38:1–211.
20. Gárate G, Pascual M, Rivero M, et al. Serum calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  and  $\beta$  levels are increased in COVID-19 inpatients. *Arch Med Res*. 2023;54:56–63.
21. Gárate G, González-Quintanilla V, González A, et al. Serum alpha and beta-CGRP levels in chronic migraine patients before and after monoclonal antibodies against CGRP or its receptor. *Ann Neurol*. 2023;94:285–94.
22. Holzmänn B. Antiinflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease. *Curr Protein Pept Sci*. 2013;14:268–74.
23. Assas BM, Miyan JA, Pennock JL. Cross-talk between neural and immune receptors provides a potential mechanism of homeostatic regulation in the gut mucosa. *Mucosal Immunol*. 2014;7:1283–9.
24. Norton CE, Grunz-Borgmann EA, Hart ML, et al. Role of perivascular nerve and sensory neurotransmitter dysfunction in inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021;320:1887–902.
25. Sharkey K. Substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in gastrointestinal inflammation. *Ann NY Acad Sci*. 1992;664:425–42.
26. Engel MA, Khalil M, Siklosi N, et al. Opposite effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in oxazolone colitis. *Dig Liv Dis*. 2012;44:24–9.
27. Li FJ, Zou YY, Ciu Y, et al. Calcitonin gene-related peptide is a promising marker in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2013;58:686–93.
28. Sternini C, Anderson K. Calcitonin gene-related peptide neurons supplying the rat digestive system: differential distribution and expression pattern. *Somatosens Mot Res*. 1992;9:45–9.
29. Furness JB, Robbins HL, Xiao J, et al. Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. *Cell Tissue Res*. 2004;317:1–12.
30. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004;50:81–92.
31. Eysselein VE, Reinshagen M, Patel S, et al. Calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease and experimental induced colitis. *Ann NY Acad Sci*. 1992;657:319–27.
32. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, et al. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;313:54–6.
33. McCulloch CR, Cooke HJ. Human alpha-calcitonin gene related peptide influences colonic secretion by acting on myenteric neurons. *Regul Pept*. 1989;24:87–96.
34. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998;114:385–91.
35. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, et al. Dextran sulphate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 1994;107:1643–54.
36. Xing L, Guo J, Wang X. Induction and expression of beta calcitonin gene-related peptide in rat T lymphocytes and its significance. *J Immunol*. 2000;165:4359–66.
37. Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2002;37:409–17.
38. Fernández S, Knopf MA, Shankar G, et al. Calcitonin gene-related peptide indirectly inhibits IL-7 responses in pre-B cells by induction of IL-6 and TNF-alpha in bone marrow. *Cell Immunol*. 2003;226:67–77.
39. Tache Y, Raybould H, Wei JY. Central and peripheral actions of calcitonin gene-related peptide on gastric secretory and motor function. *Adv Exp Med Biol*. 1991;298:183–98.
40. Evangelista S. Role of calcitonin gene-related peptide in gastric mucosal defense and healing. *Curr Pharmacol Design*. 2009;15:3571–6.
41. Plourde V, St-Pierre S, Quirion R. Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. *Am J Physiol*. 1997;273:191–6.
42. Grider JR. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am J Physiol*. 2003;266:1139–45.
43. Reinshagen M, Flamig G, Ernst S, et al. Calcitonin gene-related peptide mediates the protective effect of sensory nerves in a model of colonic injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;270:657–61.
44. Maggi CA, Guilliani S, Zagorodnyuk V. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the circular muscle of guinea-pig colon: role as inhibitory transmitter and mechanisms of relaxation. *Regul Pept*. 1996;61:27–36.
45. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*. 1990;28:183–7.
46. Rodríguez-Orsorio X, Sobrino T, Brea D, et al. Endothelial progenitor cells: a new key for endothelial dysfunction in migraine. *Neurology*. 2012;79:474–9.
47. Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, et al. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology*. 2013;81:1191–6.
48. Hofmann J, Wecker S, Neeb L, et al. Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF. *Cephalalgia*. 2012;32:659–67.
49. Gárate G, Pascual M, Olmos JM, et al. Increase in serum calcitonin-gene related peptide  $\beta$  (CGRP $\beta$ ) levels in COVID-19 patients with diarrhea: an underlying mechanism? *Dig Dis Sci*. 2022;67:5712–3.

# Publisher's Note

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



## **6.4 CUARTA PUBLICACIÓN**

Gabriel Gárate, Marta Pascual, José Manuel Olmos, Carmen Fariñas, Montserrat Rivero, Javier Crespo, Julio Pascual. Increase in Serum Calcitonin Gene-Related Peptide  $\beta$  (CGRP $\beta$ ) Levels in COVID-19 Patients with Diarrhea: An Underlying Mechanism? Dig Dis Sci. 2022 Dec;67(12):5712-5713. doi: 10.1007/s10620-022-07473-0. Epub 2022 Mar 19. PMID: 35305169; PMCID: PMC8934017.

Digestive Diseases and Sciences. IF: 3,1; SJR:38/165 (Q1); Gastroenterology.

Finalmente, esta última publicación nos ayuda a comprender mejor las acciones del beta-CGRP en el tubo digestivo. Ya fuera de la EII y en el contexto de la pandemia de COVID-19 en el 2020, diseñamos este estudio para valorar la implicación del CGRP-beta dentro de la fisiopatología de la diarrea que acontece en los pacientes con esta infección.



# Increase in Serum Calcitonin Gene-Related Peptide $\beta$ (CGRP $\beta$ ) Levels in COVID-19 Patients with Diarrhea: An Underlying Mechanism?

Gabriel Gárate<sup>1</sup> · Marta Pascual<sup>1</sup> · José Manuel Olmos<sup>1</sup> · Carmen Fariñas<sup>1</sup> · Monserrat Rivero<sup>1</sup> · Javier Crespo<sup>1</sup> · Julio Pascual<sup>1</sup>

Received: 17 February 2022 / Accepted: 1 March 2022 / Published online: 19 March 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

As recently reported in this journal by Patel et al., diarrhea is the most frequent gastrointestinal symptoms in COVID-19 hospitalized patients, but its pathophysiology is obscure [1]. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a 37-amino acid neuropeptide member of the calcitonin family. CGRP is widely distributed in the human body and can induce multiple biological effects such as vasodilation or immunomodulation. CGRP has been shown to be the key molecule explaining the pathophysiology of migraine, a disease frequently accompanied by gastrointestinal symptoms. CGRP has two forms differing two amino acids from each other: CGRP $\alpha$ , encoded in CALC-I gene, whose expression is concentrated in sensory neurons within the central nervous system, and CGRP $\beta$ , encoded in CALC-II gene, which is specifically located in the enteric nervous system [2].

Interestingly, infusion of CGRP to human volunteers induces migraine-like headache together with diarrhea [3]. Also, the main adverse event of the novel CGRP monoclonal antibodies, highly efficacious in migraine prevention, is constipation [4]. While headache is clearly related to the release of CGRP by the sensory neurons in the trigemino-vascular system, it is tempting to propose a role for the CGRP $\beta$  and its enteric receptors in the pathophysiology of CGRP-induced diarrhea.

COVID-19 infection has a wide spectrum of clinical manifestations. Headache and diarrhea, two symptoms seen with CGRP infusion, are among the most common in COVID-19 patients and could perfectly be explained by a CGRP release [1, 4]. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and the serine protease TMPRSS2, the two proteins required for COVID-19 infection, are highly coexpressed in gastrointestinal cells. There is little doubt that direct viral infection is

the likely cause of gastrointestinal manifestations, including diarrhea, in COVID-19, but the specific mechanisms involved in diarrhea pathogenesis remain unclear [1]. Our aim was to analyze the levels of CGRP $\beta$  in a series of COVID-19 patients with diarrhea.

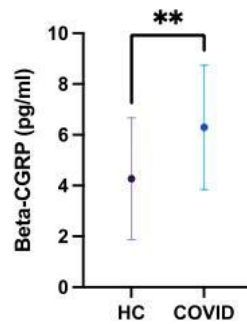
CGRP $\beta$  levels were assessed from morning fasting blood samples in 30 matched healthy controls (mean age =  $61.3 \pm 15.1$  years, range 29–89 years; 66.6% females) and 26 COVID-19 inpatients experiencing diarrhea (mean age =  $61.8 \pm 15.7$  years, range 31–91 years; 69.2% females). The study was approved by our institutional ethics committee. Twenty-two patients (85%) were receiving methylprednisolone (20–80 mg/24 h) and 25 were treated with analgesics. Samples were obtained from December 2020 to May 2021. The blood was collected from the antecubital vein and allowed to clot; afterward, serum was separated after centrifugation for 10 min at 3500 rpm. Aliquots were immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed. CGRP $\beta$  levels were determined using a commercial ELISA (CUSABIO; China) strictly following manufacturer's instructions. The detection limit of the assay was 0.39 pg/mL. CGRP $\beta$  levels were significantly elevated in COVID-19 patients ( $6.3 \pm 2.6$  pg/mL) vs controls ( $4.2 \pm 2.4$  pg/mL) (+26.2%;  $p < 0.01$ ) (Fig. 1).

We show for the first time a significant elevation in CGRP $\beta$  levels in serum of COVID-19 patients experiencing diarrhea as compared to healthy controls. This increase was clear even in the presence of drugs such as corticosteroids or analgesics, which could theoretically diminish CGRP release, supports a role for the  $\beta$  form of this ubiquitous peptide in the gastrointestinal manifestations of COVID-19, and suggests that CGRP, and its  $\beta$  isoform in particular in patients with diarrhea, could be one of the molecules released in the cytokine storm induced by COVID-19 infection. CGRP is known to enhance interleukin-6 production, the main biomarker of COVID-19 severity, which has brought the proposal that CGRP antagonists could be of help in COVID-19 infection [6]. This increase in CGRP $\beta$  levels

✉ Julio Pascual  
julio.pascual@unican.es

<sup>1</sup> University Hospital Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria and IDIVAL, Santander, Spain

**Fig. 1** Serum CGRP- $\beta$  levels of healthy controls (HC) and COVID-19 inpatients (COVID). Data are shown as average  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0.01$



also supports a role of CGRP $\beta$  isoform both in the gastrointestinal manifestations of migraine and in the constipation induced by the novel monoclonal antibodies antagonizing CGRP used in migraine prevention.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI20/01358) and IDIVAL (INNAL 20/25)

## Declarations

**Conflict of interest** There are no conflicts of interest.

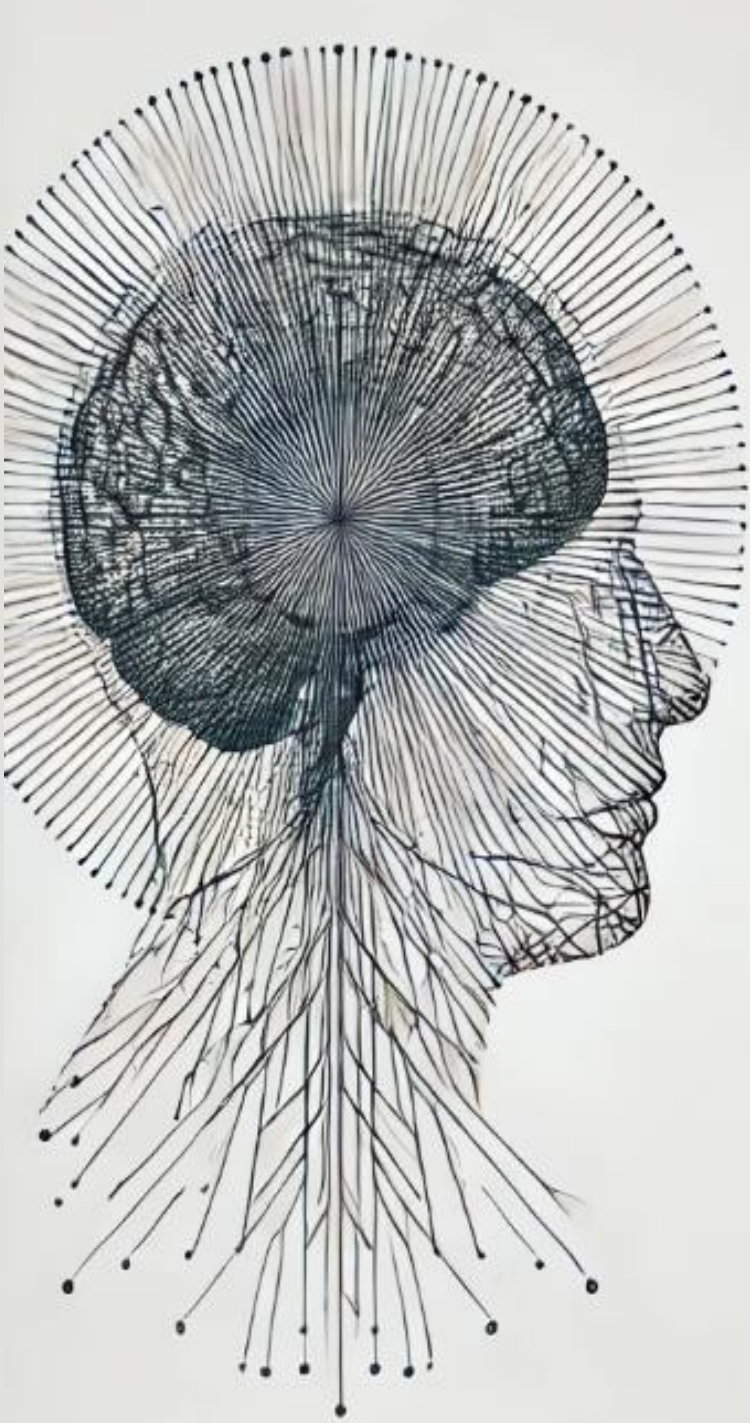
## References

1. Patel HK, Kovacic R, Chandrasekar VT et al. Correlation of gastrointestinal symptoms at initial presentation with clinical outcomes in hospitalized COVID-19 patients. Results from a large health system in the southern USA. *Dig Dis Sci*. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10620-022-07384-0>.
2. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans M. Alternative RN processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1992;298:240–244.
3. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2014;94:1099–1142.
4. Falkenberg K, Bjerg HR, Olesen J. Two-hour CGRP infusion causes gastrointestinal hyperactivity: possible relevance for CGRP antibody treatment. *Headache* 2020;60:929–937.
5. Charles A, Pozo-Rosich P. Targeting calcitonin gene-related peptide: a new era in migraine therapy. *Lancet* 2019;394:1765–1774.
6. Robertson CE. Could CGRP antagonists be helpful in the fight against COVID-19? *Headache* 2020;60:1450–1452.

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



## 7. DISCUSIÓN GLOBAL





## **7.1 PREVALENCIA DE MIGRAÑA EN EII**

El primero de los objetivos para poder realizar la investigación era confirmar o no que existe una comorbilidad entre migraña y EII. Como ya comentamos en la introducción, diversos estudios han intentado valorar esta asociación, aunque con resultados muy heterogéneos, con estudios que han encontrado una asociación significativa<sup>182-184</sup> y estudios que no<sup>176-181,185,186</sup> (Tabla 11).

La prevalencia de migraña en nuestro medio ha sido prácticamente idéntica en dos grandes estudios poblacionales llevados a cabo en nuestro país, mediante entrevista directa, de aproximadamente el 12-12,6%<sup>83,196</sup>, y muy similar a la de otros países occidentales. Así, en un metaanálisis reciente, hasta del 15,2% en una población más cercana a la de nuestro estudio (20-65 años) cumple criterios de ICHD-3 de migraña<sup>71</sup>. Como resultado principal de nuestra primera publicación, encontramos que el 20,85% de los pacientes con diagnóstico de EII cumplieron criterios de migraña probable o definitiva mediante el cuestionario validado ID-Migraine<sup>96</sup>, cifra que es significativamente superior a los estudios poblacionales en nuestro medio. Por tanto, nuestros datos confirman la asociación EII-migraña en la serie más larga publicada desde una Unidad especializada en EII, lo que asegura este diagnóstico. Es cierto que al ser pacientes procedentes de una Unidad especializada los resultados no necesariamente son extrapolables a la población general de pacientes con EII, pero pensamos que este factor no es una limitación relevante en nuestro caso particular, ya que nuestra Unidad de EII es la única de toda nuestra Comunidad Autónoma a la que acuden todo tipo de pacientes con EII.

Ahondando más en los resultados, no encontramos diferencias entre la prevalencia de migraña según subtipo de EII (CU o EC), que se mantuvieron elevadas con respecto a población general, lo cual no se había analizado específicamente en otros estudios previos. Además, encontramos una prevalencia del 6% de MC (más de 15 días de cefalea al mes), muy superior a la conocida del 2%, de forma global<sup>197</sup> y en nuestro medio<sup>84</sup>. Aunque el número de pacientes con MC no era elevado y no pudimos hacer análisis estadístico formal y hemos de ser cautelosos a la hora de extraer conclusiones definitivas, estos datos indicarían que la presencia de EII en un paciente con migraña

podría contribuir a su cronicidad, probablemente por la naturaleza inflamatoria crónica de la EII.

Otro de los resultados interesantes de nuestro estudio que merece la pena desarrollar fue que el incremento de prevalencia de migraña en pacientes con EII que encontramos pertenecía exclusivamente al género femenino, siendo la prevalencia de migraña en varones con EII similar a estudios poblacionales. En este sentido, un estudio de prevalencia de migraña en EII de nuestro país, aunque con menor número de pacientes incluidos y por esto probablemente resultados no significativos, encontró resultados similares a los nuestros, con una prevalencia de migraña del 19,7% y similar en ambos subtipos de EII y también mayor prevalencia en sexo femenino<sup>186</sup>. El hecho de que la prevalencia de la migraña sea superior en pacientes con EII podría explicarse porque en la conexión entre ambas enfermedades existieran factores asociados al sexo biológico, ya sea de tipo hormonal o ligados a cromosoma X. Otra posibilidad a considerar sería el frecuente uso de anti-inflamatorios no esteroideos como tratamiento sintomático de la migraña, ya que estos fármacos son capaces de desencadenar el inicio o la recurrencia de la EII<sup>198</sup>.

La influencia de los factores hormonales es clara en la migraña, empezando porque la prevalencia de la migraña es claramente superior en el sexo femenino. Además, la migraña se modifica con la edad reproductiva de las pacientes: las diferencias en prevalencia de migraña entre sexos se incrementan después de la pubertad, con un pico durante la edad reproductiva y una caída después de la menopausia<sup>199</sup>. De forma adicional, existe un subtipo de migraña asociada al ciclo menstrual femenino, la migraña menstrual que, aunque no está incluida en la clasificación de ICHD-3 principal, se incluye en el apéndice como aquella que ocurre típicamente entre dos días antes y tres días después del inicio del periodo, bien pudiendo ser exclusivamente durante ese periodo, o bien teniendo otras crisis fuera de la menstruación<sup>71</sup>. Hasta un 25% de las pacientes con migraña presentan crisis durante la menstruación<sup>200</sup>. Entre los mecanismos estudiados, el más aceptado es que la migraña ocurre como consecuencia de la caída de estrógenos brusca que acontece previo al inicio de la menstruación<sup>201</sup>.

Desde el punto de vista digestivo, durante el ciclo menstrual se producen de forma fisiológica cambios en la motilidad intestinal en relación con los cambios hormonales:

mientras que los estrógenos parecen fomentar la motilidad intestinal, la progesterona la disminuye <sup>202-204</sup>. Existen algunos estudios que demuestran empeoramiento de síntomas durante el ciclo menstrual en la EII, aunque no se ha terminado de correlacionar con cambios en actividad de la enfermedad<sup>205</sup>. No obstante, pacientes con EII que reciben terapia hormonal sustitutiva parecen tener menor riesgo de brote de su EII<sup>206</sup>.

Con relación específica al CGRP y sus posibles cambios durante el ciclo menstrual, se ha demostrado un incremento del CGRP durante el ciclo menstrual en mujeres con diagnóstico previo de migraña con respecto a mujeres sanas<sup>207,208</sup>. Además, el descenso de las hormonas sexuales genera una liberación de prostaglandina E2 y CGRP en la sustancia gris periacueductal, que controla la nocicepción <sup>209</sup>. En un trabajo reciente de nuestro grupo<sup>195</sup>, los niveles de alfa-CGRP sin embargo fueron superiores en hombres, mientras que los niveles de beta-CGRP fueron similares en ambos grupos, aunque hay que tener en cuenta que para nuestro análisis no se tuvo en cuenta la fase del ciclo menstrual en el caso de las mujeres.

La conexión entre ambas enfermedades, fuera de los factores relativos al sexo, se explica también mediante el eje intestino cerebro, una red de sistemas de neurotransmisores, hormonas o células inflamatorias y citoquinas que unen bidireccionalmente el SNC y SNE y regula la función del tubo digestivo. El papel de las citoquinas en la EII es bien conocido al ser la EII es una enfermedad inflamatoria crónica. La liberación de citoquinas como la interleucina 1 $\beta$ , 6 u 8, y el factor de necrosis tumoral alfa podrían jugar un papel en la cronificación de la migraña, dado que se han asociado con su liberación en la migraña<sup>210</sup>.

## **7.2 PAPEL DE ALFA-CGRP Y BETA-CGRP EN EII Y BETA CGRP EN COVID-19 CON DIARREA**

Una vez demostrada la asociación epidemiológica entre ambas enfermedades, nos planteamos si uno de sus nexos fisiopatológicos podría ser el CGRP. Su papel, en concreto el de la isoforma alfa, claramente establecido en la migraña, no está estudiado en otras enfermedades de forma tan exhaustiva. Además, no existen estudios clínicos,

ni una clara imagen del papel de la isoforma beta en el tubo digestivo. Para ello, reclutamos una población de pacientes con diagnóstico reciente de EII y sin tratamiento inmunomodulador y, tras recoger en detalle variables clínicas y demográficas, analizamos los niveles tanto de alfa como de beta-CGRP y los comparamos con un grupo de controles sanos comparables en edad y sexo y sin historia de migraña. Evaluamos la presencia de migraña en los pacientes con EII, dadas las implicaciones ya conocidas sobre los niveles de alfa-CGRP en la migraña (y en la EII como acabamos de ver). Además, añadimos una comparativa específica con una cohorte de pacientes con MC en el caso del alfa-CGRP. Desconocíamos la posible influencia de los tratamientos inmunosupresores, biológicos y cirugías en el CGRP, así que decidimos excluir a pacientes con EII con estos tratamientos en estos estudios.

### **7.2.1 ALFA-CGRP EN EII**

Reclutamos una serie suficientemente amplia, 96 pacientes, con EII con las características ya comentadas y comparamos sus resultados con 50 personas sanas y con 50 pacientes con MC (una entidad donde sabíamos que los niveles del alfa-CGRP están aumentados). En primer lugar, encontramos un incremento significativo de los niveles de alfa-CGRP, tanto en la cohorte EII global, como estratificando por EC y CU, con respecto a controles sanos. Al introducir la estratificación por diagnóstico de migraña (en los pacientes con EII) y la comparativa con la cohorte de “control” de MC, los resultados tienen aún mayor relevancia clínica, que podemos resumir de la siguiente forma:

- Los pacientes con EII tienen unos niveles de alfa-CGRP significativamente más elevados que los controles sanos. Estos niveles en la EII son similares a la cohorte de MC y a los descritos en estudios previos para la población con MC <sup>94,95,99</sup>.
- Los pacientes con EII sin migraña tienen niveles significativamente superiores de alfa-CGRP que los controles sanos.
- Los pacientes con EII y migraña tienen niveles significativamente superiores de alfa-CGRP que aquellos pacientes con EII sin migraña.

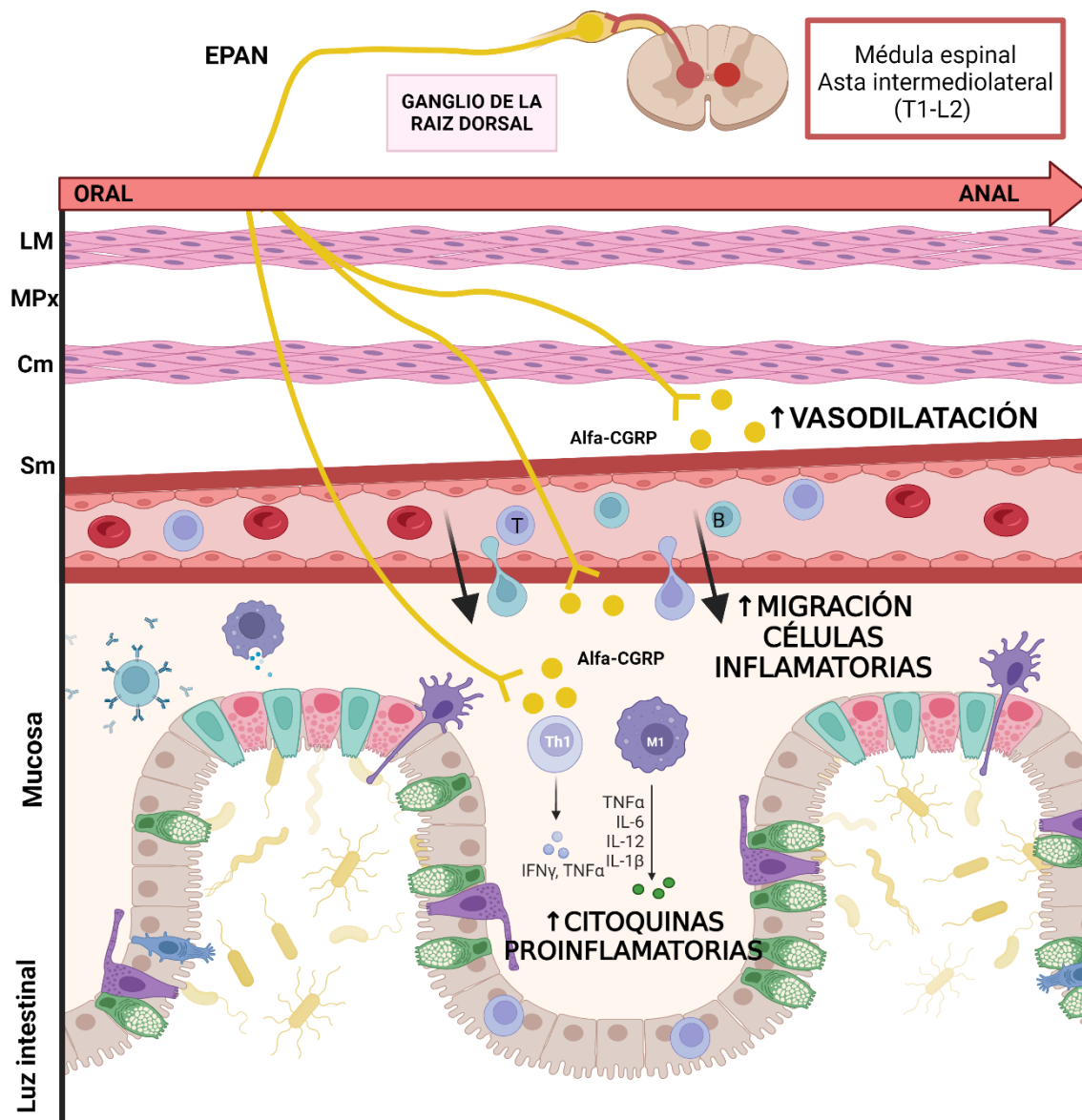
Comprobamos, además, que los niveles de alfa-CGRP no se vieron influenciados por los tratamientos autorizados en este estudio (esteroides, o 5-ASA), por la presencia de factores de riesgo cardiovascular o la comorbilidad de otras IMIDs o MEIs. Cabe destacar que, en esta cohorte de pacientes con EII en fase inicial, la prevalencia de migraña fue similar a la del estudio de prevalencia, del 17,7%, con un 3,1% de pacientes que cumplieron criterios de MC.

Estos resultados son, en nuestro criterio, interesantes porque clarifican de alguna manera el valor de la isoforma alfa-CGRP como biomarcador. Mientras que el alfa-CGRP se postulaba como un biomarcador específico de migraña y específicamente de MC (enfermedad que como hemos visto se diagnostica en este momento por criterios clínicos y que, por tanto, clama por un biomarcador objetivo), este estudio demuestra dos vertientes nuevas a tener en cuenta en su interpretación en los estudios de MC. Por un lado, que su incremento en sangre no es específico al cien por cien de la migraña y, por otro, que incluso en pacientes con EII los niveles elevados de CGRP son indicativos de la coexistencia de migraña y que hemos de tener en cuenta la existencia de comorbilidades a la hora de interpretar el valor del CGRP en la migraña. En todo caso, estos datos refuerzan la hipótesis de una conexión molecular entre ambas enfermedades, migraña y EII, mediada por la isoforma alfa de este neuropéptido.

Desde el punto de vista del sistema digestivo, el alfa-CGRP se libera en las EPAN, provenientes del ganglio de la raíz dorsal y con prolongaciones dentro de la pared intestinal alrededor de los vasos sanguíneos de la submucosa y en la mucosa intestinal<sup>110</sup>. En esta localización, su liberación genera vasodilatación de los vasos sanguíneos de la submucosa, produce la migración de células inflamatorias hacia la mucosa y fomenta la activación de estas, con liberación de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa, entre otras (figura 7). De la función teórica fisiológica se extrae sus posibles implicaciones o funciones del neuropéptido en la EII: un exceso de activación de las EPAN generaría un incremento de inflamación local en la pared intestinal.

Además, la liberación del alfa-CGRP, teóricamente según modelos experimentales<sup>93</sup>, contribuiría a la aparición de síntomas gastrointestinales como diarrea, vómitos o molestias abdominales. Esto puede ser debido a que su liberación en el suero en

cantidad significativa actuaría también sobre el intestino en otras localizaciones más típicas del beta-CGRP (ver posteriormente).



a

Figura 7. Funciones fisiológicas teóricas del alfa-CGRP en la pared intestinal. LM: muscular longitudinal, MPx: Plexo mientérico; Cm: muscular circular; Sm: Submucosa. Figura realizada con Biorender.com

El desarrollo de los nuevos tratamientos que bloquean el CGRP como tratamiento de la MC y migraña episódica de alta frecuencia sin duda han sido un gran avance en esta enfermedad: en un estudio de nuestro grupo ya se demostró que el tratamiento con los

nuevos anticuerpos monoclonales en pacientes con MC conseguía bloquear de forma efectiva el alfa-CGRP<sup>211</sup> y se correlacionaba con la mejoría clínica de los pacientes que se sometían a este tratamiento, sin modular el beta-CGRP de forma significativa. No obstante, con los resultados que hemos obtenido en EII cabría plantearse los posibles efectos (beneficiosos o deletéreos) de estos nuevos tratamientos sobre la propia EII, algo en lo que ahondaremos en el siguiente apartado.

### **7.2.2 BETA-CGRP EN EII**

Cuando en ese mismo grupo de pacientes con EII en los que medimos el alfa-CGRP determinamos los niveles de beta-CGRP de forma simultánea, los resultados son totalmente opuestos. Para nuestra sorpresa inicial, los niveles de beta-CGRP en el grupo de EII se encuentran significativamente (y de forma altamente homogénea) disminuidos con respecto a los controles sanos y también con respecto a pacientes con MC. Además, de nuevo, hay consistencia entre los subtipos de EII, ya que persisten disminuidos tanto en EC como en CU. En cuanto a la influencia de IMIDs, MEIs, tratamientos previos o factores de riesgo cardiovascular, tampoco encontramos diferencias entre grupos con respecto a beta-CGRP. De hecho, los niveles de beta-CGRP en el grupo de pacientes con MC son similares a controles sanos, lo que se explicaría por la liberación exclusiva de esta isoforma dentro del tracto gastrointestinal (y no en el sistema trigémino-vascular).

Hasta la fecha, las funciones teóricas del beta-CGRP en el tracto gastrointestinal se extraen de un reducido número de pequeños estudios en modelos animales, biopsias o piezas quirúrgicas, siendo este el primer trabajo en el que se valoran las posibles implicaciones de este neuropéptido en humanos con una enfermedad como la EII. Desarrollaremos a continuación las funciones teóricas de esta molécula en el tubo digestivo más en profundidad por medio de los estudios previamente publicados, para poder así validar los resultados de nuestro estudio.

Es importante reseñar que la isoforma beta del CGRP es la más abundante en el tubo digestivo: las concentraciones de beta-CGRP son hasta 7 veces superiores que las de alfa-CGRP en el intestino. En el tubo digestivo, el beta-CGRP se libera de forma primordial en las IPAN en el plexo mientérico, en neuronas tipo Dogiel II<sup>122</sup>. Al igual que

la isoforma alfa, la isoforma beta también participa como potente vasodilatador local, aunque de forma específica se le atribuyen otras funciones como la nocicepción, el peristaltismo intestinal o una acción antiinflamatoria/inmunotolerancia.

Los modelos experimentales en ratones CGRP *knock-out* presentaban hiperplasia linfoide y colitis de forma espontánea, lo que refuerza esta hipótesis de su posible papel protector en la mucosa intestinal<sup>212</sup>. Además, como ya comentamos previamente, en otros modelos experimentales de colitis inducida por el trinitrobenzeno sulfónico o sal sódica de sulfato de dextrano, el CGRP presentaba un papel protector sobre el daño contra la mucosa intestinal<sup>144-147</sup>. Por otro lado, también se ha demostrado su papel como neuropéptido mediador en la cicatriz de úlceras gastrointestinales, gracias a su acción vasodilatadora local que facilita la reparación tisular<sup>148</sup>. Aunque los estudios son escasos y no existen prácticamente datos en humanos, podríamos concluir que, en global, estos datos sugieren un papel protector para la isoforma beta-CGRP en el tubo digestivo.

Desde el punto de vista de la motilidad intestinal, el CGRP actúa de forma local promoviendo la relajación del músculo liso, y promueve la motilidad gastrointestinal. De hecho, la infusión de CGRP en voluntarios humanos induce diarrea (y cefalea migrañosa)<sup>93</sup> y sabemos que el principal efecto secundario de los fármacos anti-CGRP (que antagonizan alfa y beta-CGRP) es el estreñimiento<sup>168</sup>. Un descenso en sus niveles en el tracto digestivo podría, por tanto, generar un aumento de tono muscular local y potencialmente contribuir a las alteraciones de la motilidad de la EII. De hecho, en el caso de la diverticulosis, cuya fisiopatología no es totalmente clara, se ha postulado que el descenso del CGRP en la mucosa y sus alteraciones en el tono muscular podrían ser un factor que contribuya a su aparición<sup>213</sup>.

Por otro lado, el CGRP no es sólo liberado por neuronas intrínsecas, sino que se sabe que también se libera por linfocitos T<sup>114</sup>, lo que puede justificar un papel en los fenómenos de inflamación local. Aunque los linfocitos T no son necesarios para el inicio de la cascada inflamatoria, la liberación del CGRP en los linfocitos T sí parece producir fenómenos de inhibición de proliferación linfocitaria y por tanto cierto componente de inmunotolerancia. En este sentido, el CGRP inhibe la respuesta de los linfocitos B a la interleucina 7 a través de la interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral alfa. En

modelos de ratón *CGRP-null*, se desarrolla una colitis con hiperplasia linfoide a lo largo del tiempo<sup>149-150</sup>.

En cuanto a la implicación real en la EII humana, el único estudio publicado a este respecto en pacientes es un estudio de biopsias intestinales en pacientes con CU vs controles y es conceptualmente concordante con nuestros datos. Li y colaboradores<sup>214</sup>, mediante reacción en cadena de la polimerasa inversa (RT-PCR), encontraron niveles inferiores de expresión de ARN mensajero codificante de CGRP y del propio CGRP en la mucosa intestinal y además, a medida que aumentaba la severidad de la CU, existía una correlación con el descenso encontrado, de ahí que los autores postularan que la reducción del CGRP (recuérdese que los niveles de beta-CGRP son 7 veces más elevados que los de alfa-CGRP en el tubo digestivo) podría ser un posible biomarcador de CU. Estos resultados se correlacionan perfectamente con nuestros valores en suero, y además encontramos la misma reducción también en la EC, algo no estudiado previamente. El hecho de que la mayoría de los pacientes se encuentren en fases iniciales de la enfermedad (al menos en cuanto al diagnóstico) y que los niveles no se vean afectados a priori por los tratamientos iniciales instaurados, nos hace pensar que la disminución del beta-CGRP no es algo que ocurra como algo secundario y pasivo al daño crónico a la mucosa intestinal, sino que podría tener un papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal desde los inicios de la enfermedad.

En resumen, aunque los mecanismos reales por los que ocurre esta protección en la mucosa intestinal son desconocidos en su práctica totalidad, podemos sintetizar las funciones que conocemos de la molécula (figura 8) y de ahí teorizar los posibles efectos de su descenso en la EII (figura 9):

- La vasodilatación local producida por el beta-CGRP puede promover la reparación tisular, y, por tanto, en ausencia del mismo, habría más tendencia a vasoconstricción y se dificultaría la reparación tisular local.
- La liberación de beta-CGRP parece favorecer la excreción de cloro a la luz intestinal, lo que podría favorecer la eliminación de agentes tóxicos/toxinas hacia la luz intestinal. La ausencia de beta-CGRP, por tanto, podría promover el daño por toxinas la mucosa intestinal.

- El beta-CGRP actúa como propulsor de la motilidad gastrointestinal, y, en su ausencia, podría aparecer una dismotilidad intestinal en la zona afectada.
- La liberación de beta-CGRP por las IPAN y los linfocitos T inhibe la proliferación linfocitaria y promueve la inmunotolerancia. En el caso de un descenso crónico y mantenido, se promovería la proliferación y activación de los linfocitos de forma local promoviendo y cronificando la actividad inflamatoria local.

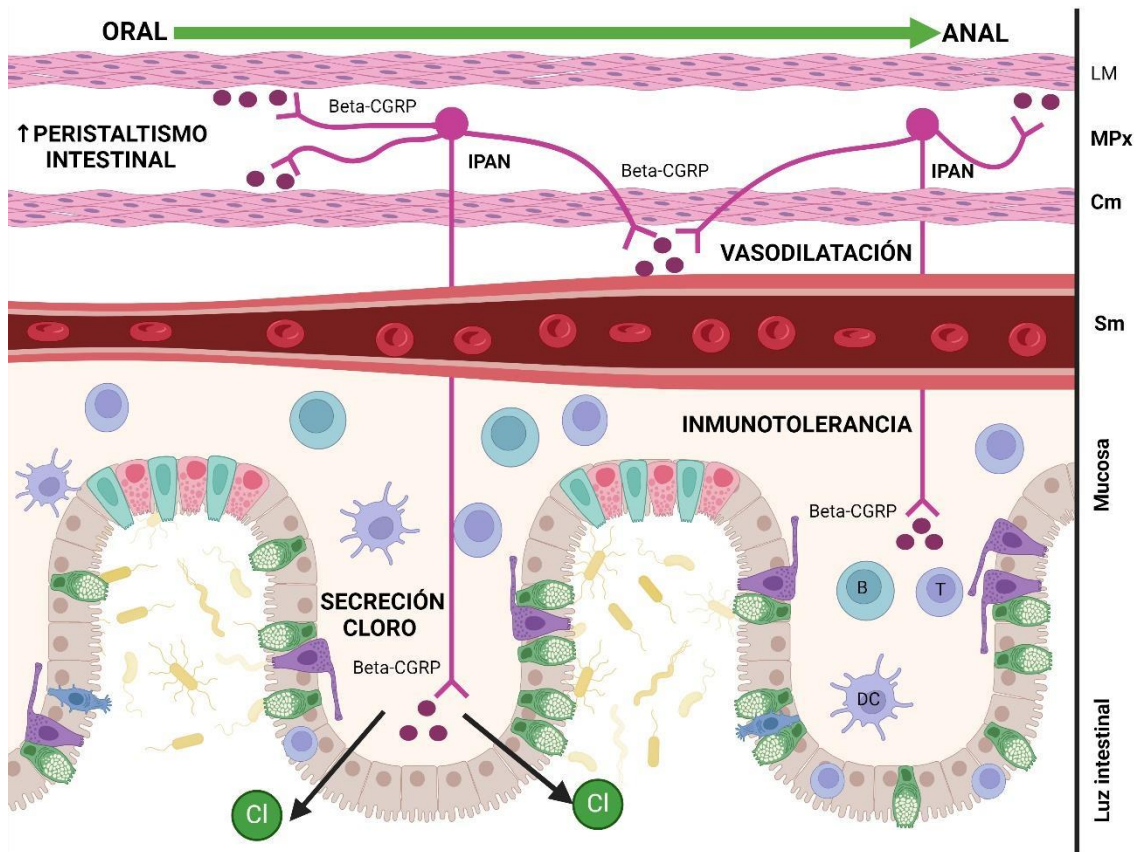


Figura 8: Funciones fisiológicas teóricas del beta-CGRP en la pared intestinal. LM: muscular longitudinal, MPx: Plexo mientérico; Cm: muscular circular; Sm: Submucosa. Figura realizada con Biorender.com

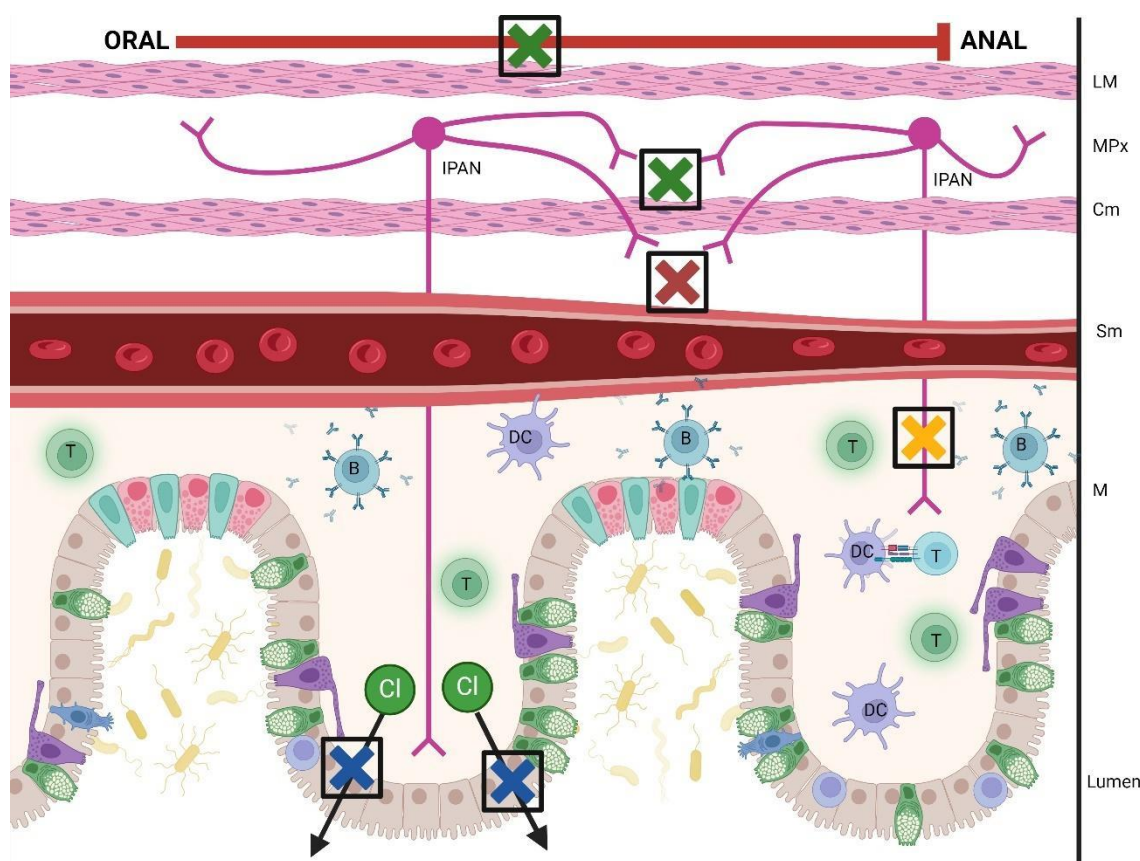


Figura 9. Consecuencias teóricas del descenso de beta-CGRP en la pared intestinal. LM: muscular longitudinal, MPx: Plexo mientérico; Cm: muscular circular; Sm: Submucosa. Figura realizada con *Biorender.com*

A modo de hipótesis, y teniendo en cuenta las mediciones simultáneas de alfa-CGRP, podríamos teorizar que esta disminución local del beta-CGRP podría intentar ser “suplida” por una liberación de alfa-CGRP en la raíz dorsal, que es lo que estaríamos viendo en suero, lo que a nivel gastrointestinal desencadenaría vasodilatación local, migración de células inflamatorias y estimulación de la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias. Además, la liberación del alfa-CGRP, como ya hemos comentado en modelos de infusión externa, estimula la motilidad gastrointestinal, generando diarrea. Otra teoría sería que el alfa-CGRP se libere en consecuencia a la activación del asta intermediolateral, secundaria a la inflamación, perpetuándola mediante los mecanismos comentados previamente. En todo caso, nuestros resultados indican que la isoforma beta del CGRP juega un claro papel protector en la mucosa gastro-intestinal y, por ende, en la fisiopatología de la EII. No podemos contestar la pregunta de si este

descenso tan uniforme es causa o consecuencia de la EII, pero es obvio que estos datos abren una nueva vía de investigación que tendrá que ser abordada en estudios futuros.

### **7.2.3 PAPEL DEL CGRP BETA EN LA INFECCIÓN POR COVID-19 CON DIARREA**

La epidemia por COVID-19 nos ofreció, de un modo inesperado, una posibilidad más de profundizar en el rol fisiopatológico del beta-CGRP en el sistema gastrointestinal. Es un hecho bien conocido que la diarrea (curiosamente junto con la cefalea de corte migrañoso) es el síntoma digestivo más frecuente en esta infección<sup>189,190</sup>.

En un intento de intentar explicar mejor las funciones fisiológicas del beta-CGRP, tomamos un modelo de infección aguda con síntomas gastrointestinales como es la infección por COVID-19 con diarrea. Reclutamos pacientes ingresados con infección por COVID-19 con diarrea durante el periodo de pandemia y los comparamos con un grupo de pacientes sanos con similar edad y sexo. Los resultados fueron claros: en aquellos pacientes con infección y diarrea, los niveles de beta-CGRP fueron significativamente más elevados que en controles sanos, lo cual, en línea con el papel del beta-CGRP en modelos experimentales de infección por *C.difficile*<sup>140</sup>, podría explicar que esta molécula sea un mediador en la aparición de diarrea en pacientes con una infección aguda por COVID-19, contribuyendo a la tormenta de citoquinas que ocurre en esta enfermedad.

Si lo pensamos por un momento, estos datos refuerzan el papel del beta-CGRP en la homeostasis de la mucosa gastrointestinal. El beta-CGRP posee realmente una acción camaleónica sobre la misma. En las infecciones agudas (por ejemplo, COVID-19) se libera dentro de la tormenta de citoquinas promoviendo la motilidad intestinal, la vasodilatación local y la expulsión, mediante diarrea, de las sustancias tóxicas. Por el contrario, en la EII su déficit desde fases iniciales promovería la inflamación local y el daño crónico de la mucosa intestinal.

## **7.3 FORTALEZAS Y LIMITACIONES**

El estudio de prevalencia de migraña en EII es el estudio con mayor número de sujetos incluidos en una consulta especializada de EII. No obstante, el hecho de que se la

población de EII proceda de una consulta específica podría no reflejar de forma real el global de la población con EII. Además, el uso de un test abreviado para el diagnóstico de migraña como el ID-Migraine<sup>85,86</sup>, a pesar de su alta especificidad (0,82) y sensibilidad (0,92), puede ser otra limitación, ya que el diagnóstico más fiable sería el de la entrevista directa por un neurólogo especializado.

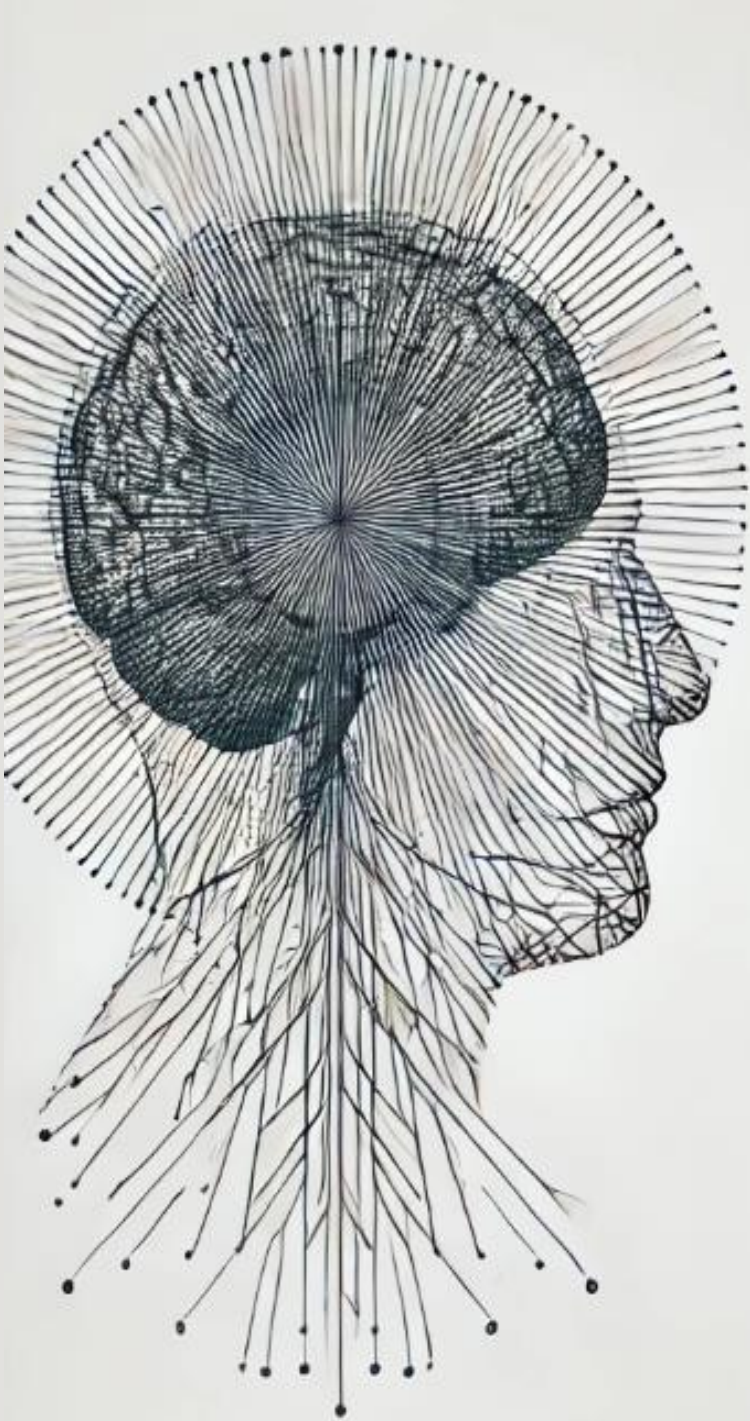
En cuanto a los estudios del CGRP en EII y COVID-19, destacaríamos la población de pacientes con diagnóstico reciente de EII incluidos (casi 100) y que son los primeros trabajos en los que se evalúa el potencial de este neuropéptido en esta enfermedad. Además, desde el punto de vista del alfa-CGRP, esta cohorte demuestra que no es un biomarcador exclusivo de la migraña, algo que se puede extrapolar con toda seguridad a otras enfermedades especialmente con componente inflamatorio, aunque es cierto que persiste la mayor sensibilidad del valor de alfa-CGRP en pacientes con MC. Si hablamos del beta-CGRP, recalcar que los resultados aquí presentados provienen del primer estudio en el que se mide selectivamente esta molécula y que demuestran su rol potencial en una patología intestinal, y sus posibles efectos teóricos y camaleónicos: mientras que en modelos de infección aguda como el COVID-19 con diarrea, el beta-CGRP se libera de forma significativa como lucha contra la infección, generando aumento de peristaltismo y contribuyendo a la tormenta de citoquinas, en la EII nos encontramos una disminución significativa que podría desencadenar una pérdida de la homeostasis gastrointestinal, alterando funciones de inmunotolerancia o liberación de toxinas de la luz intestinal.

Una de las limitaciones de los estudios podría ser que no fueron exactamente pacientes en fases iniciales de la enfermedad (aunque sí al diagnóstico), dado que en nuestra cohorte encontrábamos algunos pacientes con enfermedad fistulizante o estenosante, o de enfermedad perianal, y de pacientes con tratamiento con esteroides o 5-ASA. Desde el punto de vista ético no era viable no iniciar al menos estos tratamientos sintomáticos a los pacientes a la espera de poder recoger las muestras del suero para el estudio, especialmente en aquellos con enfermedad más grave o más sintomáticos, por lo que se intentó que los pacientes hubieran recibido el menor número de tratamientos posibles. No obstante, hay que decir que ni en pacientes con enfermedad más grave, ni pacientes con tratamientos, como ya hemos comentado previamente, se encontraron

diferencias con los niveles tanto de alfa como de beta- CGRP. En todo caso, para aclarar definitivamente el papel del CGRP en la EII, son necesarios estudios longitudinales en pacientes en diversos estadios de esta enfermedad.

En segunda instancia, el hecho de que el diseño del estudio fuera transversal y en muestras de suero, hace que sea difícil inferir causalidad definitiva entre la alteración de los niveles con la fisiopatología de la EII. Una línea futura sería valorar estudios prospectivos o estudios de biopsia intestinal, una vez estandarizados los métodos de medición (no existen en este momento métodos ELISA estandarizados para biopsia intestinal, y que la vida media del neuropéptido y su fragilidad de medición podría ser complejo de medir de forma real). En todo caso, la variabilidad (niveles bajos en EII y niveles altos en COVID-19) de los niveles del beta-CGRP encontrados en este estudio sugiere que de alguna forma los cambios fisiopatológicos en el tubo digestivo sí se trasladan a las muestras de suero como sabemos que ocurre para el CGRP liberado por el sistema trigémino-vascular en la migraña <sup>215</sup>.

## 8. CONCLUSIONES

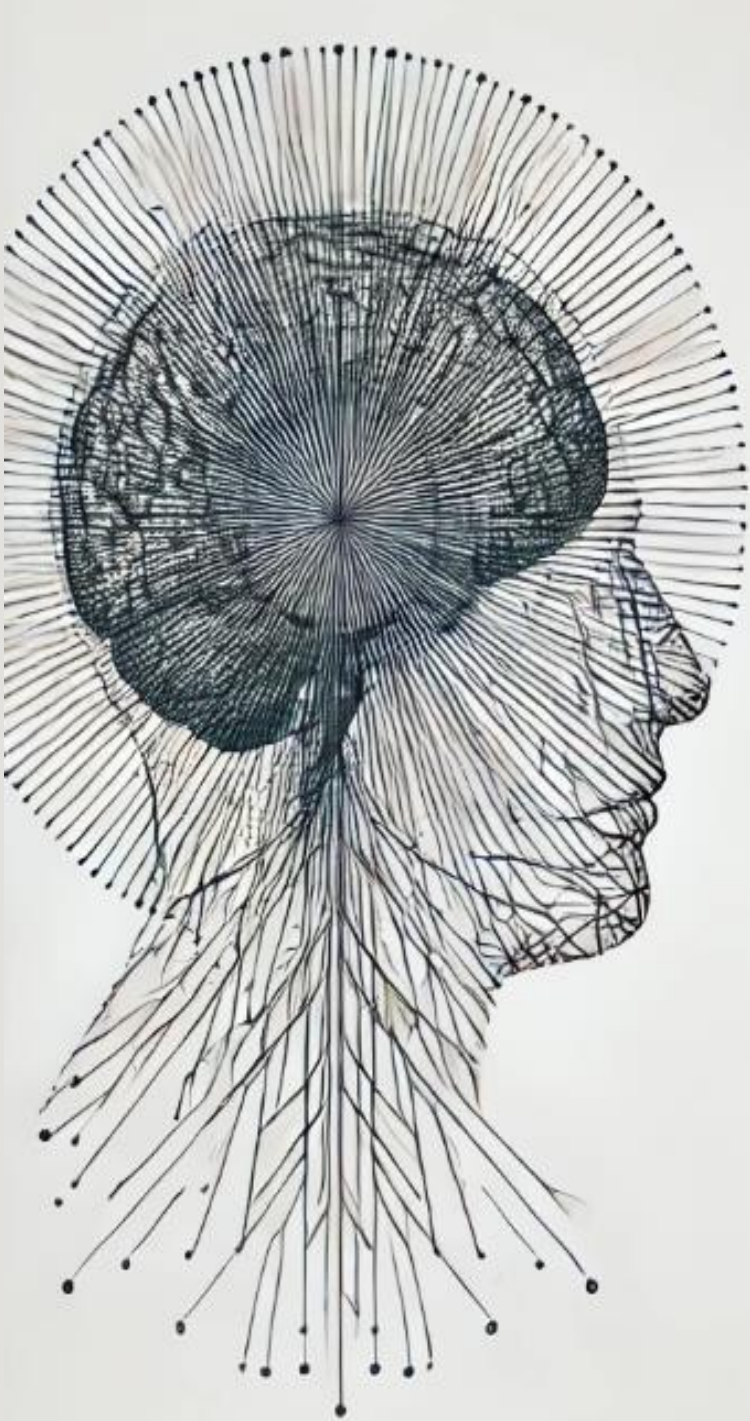




1. La prevalencia de migraña, incluyendo la de MC, está incrementada de forma significativa en pacientes con EII, siendo esta asociación mayor en las mujeres, lo que puede estar influenciado por factores relativos al sexo biológico.
2. Los niveles de alfa-CGRP se encuentran significativamente elevados en pacientes con EII en comparación con controles sanos, de forma similar a lo que ocurre en los pacientes con MC, independientemente de un diagnóstico previo de migraña.
3. Los niveles del alfa-CGRP, por tanto, no se pueden considerar como marcadores específicos y exclusivos de la migraña, si bien la mayor elevación de los niveles de alfa-CGRP en los pacientes con migraña y EII refuerza su papel como biomarcador de la migraña, siempre y cuando se tengan en cuenta comorbilidades como EII.
4. Los niveles de beta-CGRP en EII se encuentran significativamente disminuidos en pacientes con EII en fases iniciales, sugiriendo un papel protector de este neuropéptido en la homeostasis de la mucosa intestinal y dentro de la fisiopatología de la EII.
5. El incremento de los niveles de beta-CGRP en pacientes con infección por COVID-19 con diarrea podría ser uno de los mecanismos que explique la fisiopatología de la diarrea en esta y otras infecciones gastrointestinales agudas.



## 9. BIBLIOGRAFÍA





1. Grupo de trabajo en enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (GETECCU). Enfermedad inflamatoria intestinal. 4.<sup>a</sup> ed. 2019.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.e42. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.
3. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017;390(10114):2769–78. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
4. Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020;35(3):380–9. doi: 10.1111/jgh.14872.
5. Coward S, Clement F, Benchimol EI, Bernstein CN, Avina-Zubieta JA, Bitton A, et al. Past and future burden of inflammatory bowel diseases based on modeling of population-based data. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1345-53.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.002.
6. Jones GR, Lyons M, Plevris N, Jenkinson PW, Bisset C, Burgess C, et al. IBD prevalence in Lothian, Scotland, derived by capture-recapture methodology. *Gut*. 2019;68(11):1953-60. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318936.
7. Kaplan GG, Windsor JW. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(1):56-66. doi: 10.1038/s41575-020-00360-x.
8. Chaparro M, Garre A, Núñez Ortiz A, Diz-Lois Palomares M, Rodríguez C, Riestra S, et al. Incidence, clinical characteristics and management of inflammatory bowel disease in Spain: Large-scale epidemiological study. *J Clin Med*. 2021;10(13):2885. doi: 10.3390/jcm10132885.
9. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977–2011. *Am J Gastroenterol*. 2015;110:564–71. doi: 10.1038/ajg.2015.55.

10. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen RR, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:603-6. doi: 10.1038/35079114.
11. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology*. 2004;126:1533-49. doi: 10.1053/j.gastro.2004.02.067.
12. McGovern DP, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2015;149:1163-76. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.001.
13. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:1403-11. doi: 10.1046/j.1365-2036.1999.00601.x.
14. Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr*. 2009;155:421-6. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.03.017.
15. Xu L, Lochhead P, Ko Y, Claggett B, Leong RW, Ananthakrishnan AN. Systematic review and meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46:780-9. doi: 10.1111/apt.14286.
16. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results from a meta-analysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol*. 2000;91:171-6.
17. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:51. doi: 10.1186/1471-230X-12-51.
18. Zapata LB, Paulen ME, Cansino C, Marchbanks PA, Curtis KM. Contraceptive use among women with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Contraception*. 2010;82:72-85. doi: 10.1016/j.contraception.2010.02.016.
19. Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a

systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:51. doi: 10.1186/1471-230X-12-51.

20. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: an umbrella review of meta-analyses. *Gastroenterology.* 2019;157:647-59. doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.016.

21. Agrawal M, Sabino J, Frias-Gomes C, Yiannakou Y, Probert CS, Smith PJ, et al. Early life exposures and the risk of inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analyses. *EClinicalMedicine.* 2021;36:100884. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100884.

22. Ng SC, Tang W, Leong RW, Chen M, Ko Y, Studd C, et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease in Asia-Pacific: a population-based case-control study. *Gut.* 2015;64:1063-71. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307410.

23. Torres J, Hu J, Seki A, Eisele C, Nair N, Huang R, et al. Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptive immune system to germ-free mice. *Gut.* 2020;69:42-51. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317855.

24. Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy.* 2020;16:38-51. doi: 10.1080/15548627.2019.1635380.

25. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:321-35. doi: 10.1038/nri3430.

26. Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The intestinal microbiota in inflammatory bowel disease. *ILAR J.* 2015;56:192-204. doi: 10.1093/ilar/ilv011.

27. Chang JT. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2652-64. doi: 10.1056/NEJMra2002697.

28. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474:298-306. doi: 10.1038/nature10208.

29. Dolinger M, Torres J, Vermeire S. Crohn's disease. *Lancet.* 2024;403(10432):1177-91. doi: 10.1016/S0140-6736(24)00502-5.

30. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V, et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis*. 2019;13(2):144-64. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy113.
31. Sturm A, Maaser C, Calabrese E, Annese V, Fiorino G, Kucharzik T, et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects. *J Crohns Colitis*. 2019;13(3):273-84. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy114.
32. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Daperno M, Biedermann L, Garcia-Corrales L, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2012;6(10):965-90. doi: 10.1016/j.crohns.2012.09.003.
33. Dubinsky MC, Panaccione R, Lewis JD, D'Haens G, Sandborn WJ, Dotan I, et al. Impact of bowel urgency on quality of life and clinical outcomes in patients with ulcerative colitis. *Crohns Colitis* 360. 2022;4(3). doi: 10.1093/crocol/otac038.
34. De Simone B, Davies J, Chouillard E, Di Saverio S, Ghnam W, Tarasconi A, et al. WSES-AAST guidelines: management of inflammatory bowel disease in the emergency setting. *World J Emerg Surg*. 2021;16(1):23. doi: 10.1186/s13017-021-00358-3.
35. Gros B, Kaplan GG. Ulcerative colitis: a review in adults. *JAMA*. 2023;330(10):951-65. doi: 10.1001/jama.2023.14524.
36. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. *J Crohns Colitis*. 2017;11:3-25. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw168.
37. Nóbrega VG, Silva INN, Brito BS, Silva J, da Silva MCM, Santana GO. The onset of clinical manifestations in inflammatory bowel disease patients. *Arq Gastroenterol*. 2018;55:290-5. doi: 10.1590/S0004-2803.201800000-91.
38. Panés J, Rimola J. Perianal fistulizing Crohn's disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:652-64. doi: 10.1038/nrgastro.2017.104.

39. Tsai L, McCurdy JD, Ma C, Jairath V, Singh S. Epidemiology and natural history of perianal Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of population-based cohorts. *Inflamm Bowel Dis*. 2022;28:1477-84. doi: 10.1093/ibd/izab370.
40. Rogler G, Singh A, Kavanaugh A, Rubin DT. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: current concepts, treatment, and implications for disease management. *Gastroenterology*. 2021;161:1118-32. doi: 10.1053/j.gastro.2021.06.081.
41. Harbord M, Annese V, Vavricka SE, Allez M, Barreiro-de Acosta M, Boberg KM, et al. The first European evidence-based consensus on extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2016;10:239-54. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv213.
42. Trummel M, Seeholzer P, Seibold-Schmid B, Seibold F. Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:32-9. doi: 10.1002/ibd.20280.
43. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem*. 2006;52:171-81. doi: 10.1373/clinchem.2005.052381.
44. Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Yamamoto T, Tekkis PP. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:2410-22. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00771.x.
45. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:803-13. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.01050.x.
46. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*. 2006;55:426-31. doi: 10.1136/gut.2005.069476.
47. Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, et al. ECCO endoscopy consensus: European evidence-based consensus for endoscopy in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2013;7:982-1018. doi: 10.1016/j.crohns.2013.09.016.

48. Hilmi I, Kobayashi T. Capsule endoscopy in inflammatory bowel disease: when and how. *Intest Res*. 2020;18(3):265-74. doi: 10.5217/ir.2020.00047.
49. Rondonotti E, Pennazio M, Toth E, et al. Small-bowel capsule endoscopy and device-assisted enteroscopy: ESGE technical review. *Endoscopy*. 2018;50:423-46. doi: 10.1055/a-0589-1862.
50. Greener T, Klang E, Yablecovitch D, et al.; Israeli IBD Research Nucleus (IIRN). The impact of magnetic resonance enterography and capsule endoscopy on the reclassification of disease in patients with known Crohn's disease: a prospective Israeli IBD Research Nucleus (IIRN) Study. *J Crohns Colitis*. 2016;10:525-31. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw006.
51. Crocco S, Martelossi S, Giurici N, Villanacci V, Ventura A. Upper gastrointestinal involvement in paediatric onset Crohn's disease: prevalence and clinical implications. *J Crohns Colitis*. 2012;6:51-5. doi: 10.1016/j.crohns.2011.07.008.
52. Langner C, Magro F, Driessen A, et al.; European Society of Pathology; European Crohn's and Colitis Foundation. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch*. 2014;464:511-27. doi: 10.1007/s00428-014-1556-8.
53. Tanaka M, Saito H, Fukuda S, Sasaki Y, Munakata A, Kudo H. Simple mucosal biopsy criteria differentiating among Crohn disease, ulcerative colitis, and other forms of colitis: measurement of validity. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35:281-6. doi: 10.1080/003655200750024305.
54. Tanaka M, Riddell RH. The pathological diagnosis and differential diagnosis of Crohn's disease. *Hepatogastroenterology*. 1990;37:18-31.
55. Panés J, Bouzas R, Chaparro M, et al. Systematic review: the use of ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for the diagnosis, assessment of activity and abdominal complications of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34:125-45. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04710.x.

56. Desmond AN, O'Regan K, Curran C, et al. Crohn's disease: factors associated with exposure to high levels of diagnostic radiation. *Gut*. 2008;57:1524-9. doi: 10.1136/gut.2008.152728.
57. Kucharzik T, Kannengiesser K, Petersen F. The use of ultrasound in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2017;30:135-44. doi: 10.20524/aog.2017.0122.
58. Mocci G, Migaleddu V, Cabras F, et al. SICUS and CEUS imaging in Crohn's disease: an update. *J Ultrasound*. 2017;20:1-9. doi: 10.1007/s40477-016-0226-0.
59. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749-53. doi: 10.1136/gut.2005.082909.
60. Rice-Oxley JM, Truelove SC. Ulcerative colitis: course and prognosis. *Lancet*. 1950;255:663-6. doi: 10.1016/S0140-6736(50)91951-6.
61. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with placebo or infliximab. *Gastroenterology*. 2009;137:1250-60. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.061.
62. Tsai L, Ma C, Dulai PS, et al. Contemporary risk of surgery in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohorts. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;19(10):2031-45. doi: 10.1016/j.cgh.2020.11.052.
63. Alsafi Z, Snell A, Segal JP. Prevalence of 'pouch failure' of the ileoanal pouch in ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2022;37(2):357-64. doi: 10.1007/s00384-021-04060-0.
64. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;8:244-50. doi: 10.1097/00054725-200207000-00002.
65. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ; Practical Parameters Committee of American College of Gastroenterology. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:465-83. doi: 10.1038/ajg.2008.168.

66. Pariente B, Mary JY, Danese S, et al. Development of the Lémann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2015;148:52-63. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.027.
67. Pariente B, Torres J, Burisch J, et al. Validation and update of the Lémann index to measure cumulative structural bowel damage in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2021;161:853-64. doi: 10.1053/j.gastro.2021.05.002.
68. Rivera Panizo I. Impacto de la cefalea en el primer nivel asistencial. [tesis doctoral]. Santander: Universidad de Cantabria (UC); 2024.
69. Bigal ME, Lipton RB. Headache classification. En: McMahon S, Koltzenburg M, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 5th ed. Churchill & Livingstone; 2006. p. 881-93. ISBN: 978-0-443-07287-1.
70. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders: 1st edition. *Cephalalgia*. 1998;18(Suppl 1):1-96.
71. Headache Classification Committee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018; 38:1-211.
72. Sociedad Española de Neurología. Manual de Práctica Clínica en Cefaleas: Recomendaciones diagnóstico-terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología. Madrid: Ediciones Luzán 5; 2020. p. 45-164.
73. Dodick DW. Migraine. *Lancet*. 2018;391(10127):1315-30. doi:10.1016/S0140-6736(18)30478-1.
74. Giffin NJ, Ruggiero L, Lipton RB, Silberstein SD, Tvedskov JF, Olesen J, et al. Premonitory symptoms in migraine: An electronic diary study. *Neurology*. 2003;60:935-40. doi: 10.1212/01.WNL.0000052992.58526.A9.
75. Nosedá R, Burstein R. Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression,

sensitization, and modulation of pain. *Pain*. 2013;154(Suppl 1). doi: 10.1016/j.pain.2013.07.021.

76. DeLange JM, Cutrer FM. Our evolving understanding of migraine with aura. *Curr Pain Headache Rep*. 2014;18(10):453. doi: 10.1007/s11916-014-0453-3.

77. Christensen RH, Eigenbrodt AK, Ashina H, Steiner TJ, Ashina M. What proportion of people with migraine report postdromal symptoms? A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cephalalgia*. 2023;43(10):1075-87. doi: 10.1177/03331024231165626.

78. Saylor D, Steiner TJ. La carga global del dolor de cabeza. *Semin Neurol*. 2018;38:182-90. doi: 10.1055/s-0038-1649503

79. Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2017 (GBD 2017) Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability 1990-2017. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME); 2018. *Lancet*. 2018;392:1789-858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.

80. Buse DC, Powers SW, Gelfand AA, VanderPluym JH, Fanning KM, Reed ML, et al. Adolescent perspectives on the burden of a parent's migraine: Results from the CaMEO Study. *Headache*. 2018;58(4):512-24. doi:10.1111/head.13254.

81. Ashina M, Katsarava Z, Do TP, Buse DC, Pozo-Rosich P, Özge A, et al. Migraine: epidemiology and systems of care. *Lancet*. 2021;397(10283):1485-95. doi:10.1016/S0140-6736(20)32160-7.

82. Stovner LJ, Nichols E, Steiner TJ, Abd-Allah F, Abdelalim A, Al-Raddadi RM, et al. Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2018;17(11):954-76. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30322-3.

83. Stovner LJ, Zwart JA, Hagen K, Terwindt GM, Pascual J. Epidemiology of headache in Europe (review). *Eur J Neurol*. 2006;13:333-45. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01184.x.

84. Matías-Guiu J, Porta-Etessam J, Mateos V, Díaz-Insa S, Lopez-Gil A, Fernández C, Scientific Committee of the PALM Program. One-year prevalence of migraine in Spain: a

nationwide population-based survey. *Cephalalgia*. 2011;31(4):463-70. doi: 10.1177/0333102410385587.

85. Castillo J, Muñoz P, Guitera V, Pascual J. Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache*. 1999;39:190-6. doi: 10.1046/j.1526-4610.1999.3903190.x

86. Lipton RB, Dodick D, Sadovsky R, Kolodner K, Endicott J, Hettiarachchi J, et al. A self-administered screener for migraine in primary care: the ID Migraine™ validation study. *Neurology*. 2003;61:375-82. doi: 10.1212/01.WNL.0000078940.53438.83.

87. Rodríguez-Rivas R, Moreno-Martínez CA, Cerqueira TL, Enríquez-Peregrino KG, Martínez-Piña DA, Vargas-Rodríguez JN, et al. Translation, cross-cultural adaptation, and validation of a Latin American Spanish version of the ID Migraine screening test. *Headache*. 2023;63(7):872-9. doi: 10.1111/head.14469

88. González Oria C, Jurado Cobo CM, Viguera Romero J. Guía oficial de cefaleas 2019. Grupo de Estudio de Cefaleas de la Sociedad Andaluza de Neurología (SANCE). Madrid: SANCE; 2019. p. 12-32.

89. Burstein R, Nosedá R, Borsook D. Migraine: Multiple processes, complex pathophysiology. *J Neurosci*. 2015;35:6619-29. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0373-15.2015.

90. Leira R, Noya M. Fisiopatología de la migraña. *Rev Clin Esp* 1995; 195 (supo 2): 16-19

91. Aurora SK, Brin MF. Chronic migraine: An update on physiology, imaging, and the mechanism of action of two available pharmacologic therapies. *Headache*. 2017;57:109-25. doi: 10.1111/head.13072.

92. Ashina M, Hansen JM, Do TP, Melo-Carrillo A, Burstein R, Moskowitz MA. Migraine and the trigeminovascular system-40 years and counting. *Lancet Neurol*. 2019;18:795-804. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30185-1.

93. Falkenberg K, Bjerg HR, Olesen J. Two-hour infusion causes gastrointestinal hyperactivity: possible relevance for CGRP antibody treatment. *Headache*. 2020;60:929-37. doi: 10.1111/head.13820

94. Rodríguez-Osorio X, Sobrino T, Brea D, Martínez F, Castillo J, Leira R. Endothelial progenitor cells: a new key for endothelial dysfunction in migraine. *Neurology*. 2012;79:474-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e31825dd3f8
- 95-. Ashina M, Bendsten L, Jensen R, et al. Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain*. 2000;86:133-6. doi: 10.1016/S0304-3959(00)00241-5.
96. Alpuente A, Gallardo VJ, Asskour L, et al. Salivary CGRP can monitor the different migraine phases: CGRP (in)dependent attacks. *Cephalalgia*. 2022;42:186-96. doi: 10.1177/03331024211045691.
97. Kamm K, Straube A, Ruscheweyh R. Calcitonin gene-related peptide levels in tear fluid are elevated in migraine patients compared to healthy controls. *Cephalalgia*. 2019;39:1535-43. doi: 10.1177/0333102419869802.
98. Van Dogen RM, Zielman R, Noga M, et al. Migraine biomarkers in cerebrospinal fluid: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia*. 2017;37:49-63. doi: 10.1177/0333102416642602.
99. 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;81:1191-6. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a6cb72.
100. Ailani J, Kaiser EA, Mathew PG, McAllister P, Russo AF, Vélez C, et al. Role of calcitonin gene-related peptide on the gastrointestinal symptoms of migraine-clinical considerations: a narrative review. *Neurology*. 2022;99(19):841-53. doi:10.1212/WNL.0000000000201056.
101. Atanasova KR, Reznikov LR. Neuropeptides in asthma, chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis. *Respir Res*. 2018;19(1):1-18. doi:10.1186/s12931-018-0800-5.
102. Kumar A, Williamson M, Hess A, DiPette DJ, Potts JD. Alpha-Calcitonin Gene Related Peptide: New Therapeutic Strategies for the Treatment and Prevention of

Cardiovascular Disease and Migraine. *Front Physiol.* 2022;13:1-18. doi:10.3389/fphys.2022.859122.

103. Xu F, Sun W. Network Meta-Analysis of Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonists for the Acute Treatment of Migraine. *Front Pharmacol.* 2019;10:1-10. doi:10.3389/fphar.2019.00868.

104. Haghdoust F, Puledda F, Garcia-Azorin D, Huessler EM, Messina R, Pozo-Rosich P. Evaluating the efficacy of CGRP mAbs and gepants for the preventive treatment of migraine: A systematic review and network meta-analysis of phase 3 randomised controlled trials. *Cephalalgia.* 2023;43(4):365-375. doi:10.1177/03331024221148556.

105. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature.* 1982;298:240-4. doi:10.1038/298240a0.

106. Rosenfeld MG, Mermod J, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature.* 1983;304:129-35. doi:10.1038/304129a0.

107. Hay DL. CGRP Receptor Biology: Is There More Than One Receptor? In: Brain S, Geppetti P, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 255, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Mechanisms. Springer; 2018. p. 13-23. doi:10.1007/978-3-319-89698-5\_2.

108. Russo AF, Nelson C, Roos BA, Rosenfeld MG. Differential regulation of the coexpressed calcitonin/ $\alpha$ -CGRP and  $\beta$ -CGRP neuroendocrine genes. *J Biol Chem.* 1988;263(1):5-8. doi:10.1016/S0021-9258(18)68565-3.

109. Schütz B, Mauer D, Salmon AM, Changeux JP, Zimmer A. Analysis of the cellular expression pattern of  $\beta$ -CGRP in  $\alpha$ -CGRP-deficient mice. *J Comp Neurol.* 2004;476(1):32-43. doi:10.1002/cne.20204.

110. Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burrin JM, Legon S, Polak JM, Bloom SR. Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience.* 1988;25(1):195-205. doi:10.1016/0306-4522(88)90018-5.

111. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998;393(6683):333-9. doi:10.1038/30666.
112. Weston C, Winfield I, Harris M, Hodgson R, Shah A, Dowell SJ, Mobarec JC, Woodlock DA, Reynolds CA, Poyner DR, Watkins HA, Ladds G. Receptor activity-modifying protein-directed G protein signaling specificity for the calcitonin gene-related peptide family of receptors. *J Biol Chem*. 2016;291(42):21925-44. doi:10.1074/jbc.M116.737577.
113. Iyengar S, Ossipov MH, Johnson KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain*. 2017;158(4):543-59. doi:10.1097/j.pain.0000000000000831.
114. Russo AF, Hay DL. CGRP physiology, pharmacology, and therapeutic targets: migraine and beyond. *Physiol Rev*. 2023;103(2):1565-644. doi:10.1152/physrev.00030.2022.
115. Wang X, Xing L, Xing Y, Tang Y, Han C. Identification and characterization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from lymphocytes of the rat. *J Neuroimmunol*. 1999;94:110-5. doi:10.1016/S0165-5728(98)00188-7.
116. Yuan K, Zheng J, Shen X, Wu Y, Han Y, Jin X, Huang X. Sensory nerves promote corneal inflammation resolution via CGRP mediated transformation of macrophages to the M2 phenotype through the PI3K/AKT signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2022;102:108468. doi:10.1016/j.intimp.2021.108468.
117. Eftekhari S, Warfvinge K, Blixt FW, Edvinsson L. Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. *J Pain*. 2013;14(11):1289-303. doi:10.1016/j.jpain.2013.03.008.
118. Mikami N, Matsushita H, Kato T, Kawasaki R, Sawazaki T, Kishimoto T, Ogitani Y, Watanabe K, Miyagi Y, Sueda K, Fukada S, Yamamoto H, Tsujikawa K. Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions. *J Immunol*. 2011;186(12):6886-93. doi:10.4049/jimmunol.1003868.

119. Ye F, Deng PY, Li D, Luo D, Li NS, Deng S, Deng HW, Li YJ. Involvement of endothelial cell-derived CGRP in heat stress-induced protection of endothelial function. *Vasc Pharmacol*. 2007;46(4):238-46. doi:10.1016/j.vph.2007.01.004.
120. Hou Q, Barr T, Gee L, Vickers J, Wymer J, Borsani E, Rodella L, Getsios S, Burdo T, Eisenberg E, Guha U, Lavker R, Kessler J, et al. Keratinocyte expression of CGRP $\beta$ : implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. *Pain*. 2011;152(9):2036-51. doi:10.1016/j.pain.2011.04.009.
121. Wang W, Jia L, Wang T, Sun W, Wu S, Wang X. Endogenous calcitonin gene-related peptide protects human alveolar epithelial cells through protein kinase C $\epsilon$  and heat shock protein. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20325-30. doi:10.1074/jbc.M501452200.
122. Engel MA, Becker C, Reeh PW, Neurath MF. Role of sensory neurons in colitis: Increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(4):1030-3. doi:10.1002/ibd.21470.
123. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;313(5997):54-6. doi:10.1038/313054a0.
124. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev*. 2004;84(3):903-34. doi:10.1152/physrev.00037.2003.
125. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T, Bose C, Foulkes R, Hughes B. Antagonistic effect of human  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide (8-37) on regional hemodynamic actions of rat islet amyloid polypeptide in conscious Long-Evans rats. *Diabetes*. 1991;40:948-51. doi:10.2337/diab.40.7.948.
126. Ando K, Pegram BL, Frohlich ED. Hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1990;258(2 Pt 2). doi:10.1152/ajpregu.1990.258.2.R425.
127. Chai W, Mehrotra S, Jan Danser AH, Schoemaker RG. The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol*. 2006;531(1-3):246-53. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.014.

128. Assas BM, Pennock JI, Miyan JA. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. *Front Neurosci.* 2014;8:1-10. doi:10.3389/fnins.2014.00023.
129. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. In: *Immunopharmacology.* 1997;37:371-8. doi:10.1016/S0162-3109(97)81119-0.
130. Shepherd AJ, Downing JEG, Miyan JA. Without nerves, immunology remains incomplete - In vivo veritas. *Immunology.* 2005;116(2):145-63. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02209.x.
131. Manning BM, Gruba SM, Meyer AF, Haynes CL. Neuropeptide-induced mast cell degranulation and characterization of signaling modulation in response to IgE conditioning. *ACS Chem Biol.* 2016;11(11):3077-83. doi:10.1021/acscchembio.6b00675.
132. Balcziaik LK, Russo AF. Dural immune cells, CGRP, and migraine. *Front Neurol.* 2022;13(March):1-13. doi:10.3389/fneur.2022.862323.
133. Duan JX, Zhou Y, Zhou AY, Guan XX, Liu T, Yang HH, Xie H, Chen P. Calcitonin gene-related peptide exerts anti-inflammatory property through regulating murine macrophages polarization in vitro. *Molecular Immunol.* 2017;91(August):105-13. doi:10.1016/j.molimm.2017.09.007.
134. Plourde V, St-Pierre S, Quirion R. Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. *Am J Physiol.* 1997;273. doi:10.1152/ajpgi.1997.273.1.G191.
135. Grider JR. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am J Physiol.* 2003;266. doi:10.1152/ajpgi.1994.266.6.G1139.
136. Manela FD, Ren J, Gao J, McGuigan JE, Harty RF. Calcitonin gene-related peptide modulates acid-mediated regulation of somatostatin and gastrin release from rat antrum. *Gastroenterology.* 1995;109(3):701-6. doi:10.1016/0016-5085(95)90378-2.
137. Holzer P, Bartho L, Matusak O, Bauer V. Calcitonin gene-related peptide action on intestinal circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1989;256(3). doi:10.1152/ajpgi.1989.256.3.G546.

138. Ono T, Nagao M, Imoto H, Watanabe K, Tanaka N, Motoi F, Naitoh T, Unno M. Effects of calcitonin gene-related peptide on colonic motility and defecation in conscious dogs. *J Gastrointest Surg*. 2018;22(12):2097-103. doi:10.1007/s11605-018-3897-6.
139. Kaiser EA, Rea BJ, Kuburas A, Kovacevich BR, Garcia-Martinez LF, Recober A, et al. Anti-CGRP antibodies block CGRP-induced diarrhea in mice. *Neuropeptides*. 2017;64:95-9. doi:10.1016/j.npep.2017.04.003.
140. Keates AC, Castagliuolo I, Qiu B, Nikulasson S, Sengupta A, Pothoulakis C. CGRP upregulation in dorsal root ganglia and ileal mucosa during *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1998;274(1). doi:10.1152/ajpgi.1998.274.1.G196.
141. Lai NY, Musser MA, Pinho-Ribeiro FA, Baral P, Jacobson A, Ma P, et al. Gut-innervating nociceptor neurons regulate Peyer's patch microfold cells and SFB levels to mediate *Salmonella* host defense. *Cell*. 2020;180(1):33-49.e22. doi:10.1016/j.cell.2019.12.006.
142. Yoshikawa R, Mikami N, Otani I, Kishimoto T, Nishioka S, Hashimoto N, et al. Suppression of ovalbumin-induced allergic diarrhea by diminished intestinal peristalsis in RAMP1-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410(3):389-93.
143. Yang D, Jacobson A, Meerschaert KA, Sifakis JJ, Wu M, Chen X, et al. Nociceptor neurons direct goblet cells via a CGRP-RAMP1 axis to drive mucus production and gut barrier protection. *Cell*. 2022;185(22):4190-205.e25. doi:10.1016/j.cell.2022.09.006.
144. Pan XQ, Gonzalez JA, Chang S, Chacko S, Wein AJ, Malykhina AP. Experimental colitis triggers the release of substance P and calcitonin gene-related peptide in the urinary bladder via TRPV1 signaling pathways. *Exp Neurol*. 2010;225(2):262-73. doi:10.1016/j.expneurol.2010.06.014.
145. Thompson BJ, Washington MK, Kurre U, et al. Protective roles of alpha calcitonin and beta-calcitonin gene-related peptide in spontaneous and experimentally induced colitis. *Dig Dis Sci*. 2008;53:229-41. doi:10.1007/s10620-007-9874-x.
146. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004;50:81-92. doi:10.1016/j.vascn.2004.02.004.

147. Eysselien VE, Reinshagen M, Patel S, et al. Calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease and experimentally induced colitis. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;657:319-27. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb22803.x
148. Evangelista S. Role of calcitonin gene-related peptide in gastric mucosal defense and healing. *Curr Pharmacol Design.* 2009;15:3571-6.
149. Fernández S, Knopf MA, Shankar G, et al. Calcitonin gene-related peptide indirectly inhibits IL-7 responses in pre-B cells by induction of IL-6 and TNF-alpha in bone marrow. *Cell Immunol.* 2003;226:67-77. doi:10.1016/S0008-8749(03)00096-3
150. Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2002;37:409-17. doi:10.1007/s005350200064.
151. Asghar MS, Hansen AE, Amin FM, van der Geest RJ, Koning P van der, Larsson HBW, Olesen J, Ashina M. Evidence for a vascular factor in migraine. *Ann Neurol.* 2011;69(4):635-45. <https://doi.org/10.1002/ana.22292>
152. Domínguez C, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, et al. CGRP and PTX3 as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine: an observational study. *Headache.* 2018;58:78-87. doi:10.1111/head.13212
153. 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;156:820-4. doi:10.1097/j.pain.000000000000119
154. Alpuente A, Gallardo VJ, Asskour MLT, et al. Salivary CGRP and erenumab treatment response: towards precision medicine in migraine. *Ann Neurol.* 2022;92:846-59. doi:10.1002/ana.26487
155. Gárate G, González-Quintanilla V, González A, et al. Serum alpha and beta-CGRP levels in chronic migraine patients before and after monoclonal antibodies against CGRP or its receptor. *Ann Neurol.* 2023;94:285-94. doi:10.1002/ana.26604
156. Rissardo JP, Caprara ALF. Gepants for Acute and Preventive Migraine Treatment: A Narrative Review. *Brain Sci.* 2022;12(12):1645. doi:10.3390/brainsci12121645

157. Raffaelli B, Neeb L, Reuter U. Monoclonal antibodies for the prevention of migraine. *Expert Opin Biol Ther*. 2019;19(12):1307-17. doi:10.1080/14712598.2019.1667766
158. Holland PR, Goadsby PJ. Targeted CGRP small molecule antagonists for acute migraine therapy. *Neurotherapeutics*. 2018;15(2):304-12. doi:10.1007/s13311-018-0611-3
159. rgyriou AA, Mantovani E, Mitsikostas DD, Vikelis M, Tamburin S. A systematic review with expert opinion on the role of gepants for the preventive and abortive treatment of migraine. *Expert Rev Neurother*. 2022;22(6):469-88. doi:10.1080/14737175.2022.2066679
160. Silvestro M, Orologio I, Siciliano M, Trojsi F, Tessitore A, Tedeschi G, Russo A. Emerging drugs for the preventive treatment of migraine: a review of CGRP monoclonal antibodies and gepants trials. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2023;28(2):79-96. doi:10.1080/14728214.2023.2185606
161. Jensen C, Lipton R, Blumenfeld A, Croop R, Thiry A, L'Italien G, Morris B, Coric V, Goadsby P. Rimegepant for the Acute Treatment of Migraine in Patients with a History of Triptan Treatment Failure: Pooled Results From 3 Phase 3 Clinical Trials (4914). *Neurology*. 2021;96:4914.
162. European Medicines Agency. VYDURA 75 mg oral lyophilisate: EU summary of product characteristics. European Medicines Agency. 2022 Jul 2. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vydura>
163. European Medicines Agency. Aquipta. European Medicines Agency. 2023. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/aquipta>
164. Lee MJ, Al-Karaghali MAM, Reuter U. New migraine prophylactic drugs: Current evidence and practical suggestions for non-responders to prior therapy. *Cephalalgia*. 2023;43(2):204-11. doi:10.1177/03331024221130943
165. Torres-Ferrus M, Alpuente A, Pozo-Rosich P. How much do calcitonin gene-related peptide monoclonal antibodies improve the quality of life in migraine? A patient's perspective. *Curr Opin Neurol*. 2019;32(3):395-404. doi:10.1097/WCO.0000000000000683

166. Silberstein SD, Reshef S, Cohen JM, Gandhi S, Seminerio M, Ramirez Campos V, Kessler Y, Thompson SF, Blumenfeld A. Adverse Events Reported with Therapies Targeting the CGRP Pathway During the First 6 Months Post-launch: A Retrospective Analysis Using the FDA Adverse Events Reporting System. *Adv Ther.* 2023;40(2):445-59. doi:10.1007/s12325-022-02343-0
167. Murray AM, Stern JJ, Robertson CE, Chiang CC. Real-world patient experience of CGRP-targeting therapy for migraine: A narrative review. *Curr Pain Headache Rep.* 2022;26(10):783-94. doi:10.1007/s11916-022-01041-2
168. Holzer P, Holzer-Pettsche U. Constipation caused by anti-calcitonin gene-related peptide migraine therapeutics explained by antagonism of calcitonin gene-related peptide's motor-stimulating and prosecretory function in the intestine. *Front Pharmacol.* 2023;14:1179. doi:10.3389/fphar.2023.1179367
169. Torres-Ferrús M, Gallardo VJ, Alpuente A, Caronna E, Gine-Cipres E, Pozo-Rosich P. The impact of anti-CGRP monoclonal antibodies in resistant migraine patients: a real-world evidence observational study. *J Neurol.* 2021;268(10):3789-98. doi:10.1007/s00415-020-10351-2
170. Sacco S, Lampl C, Amin FM, Braschinsky M, Deligianni C, Uludüz D, Versijpt J, Ducros A, Gil-Gouveia R, Katsarava Z, Martelletti P, Ornello R, Raffaelli B, Boucherie DM, Pozo-Rosich P, Sanchez-del-Rio M, Sinclair A, Maassen van den Brink A, Reuter U. European Headache Federation (EHF) consensus on the definition of effective treatment of a migraine attack and of triptan failure. *J Headache Pain.* 2022;23(1):30. doi:10.1186/s10194-022-01366-2
171. Charles AC, Digre KB, Goadsby PJ, Robbins MS, Hershey A. Calcitonin gene-related peptide-targeting therapies are a first-line option for the prevention of migraine: An American Headache Society position statement update. *Headache.* 2024;64(4):333-41. doi:10.1111/head.14575
172. Gárate G. Especificidad y sensibilidad de los niveles de CGRP en migraña crónica [tesis doctoral]. Santander: Universidad de Cantabria (UC); 2024.

173. Gárate G, Pascual J, Pascual-Mato M, Madera J, Muñoz-San Martín M, González-Quintanilla V. Untangling the mess of CGRP levels as a migraine biomarker: an in-depth literature review and analysis of our experimental experience. *J Headache Pain*. 2024;25(1):69. doi: 10.1186/s10194-024-01769-4.
174. Agirman G, Yu KB, Hsiao EY. Signaling inflammation across the gut-brain axis. *Science*. 2021;374(6571):1087-92. doi:10.1126/science.abi6087.
175. Arzani M, Jahromi SR, Ghorbani Z, Vahabizad F, Martelletti P, Ghaemi A, et al. Gut-brain axis and migraine headache: a comprehensive review. *J Headache Pain*. 2020;21(1):15. doi:10.1186/s10194-020-1086-8.
176. Anadol Kelleci U, Calhan T, Sahin A, et al. The prevalence of headache in Crohn's disease: single-center experience. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:6474651. doi:10.1155/2016/6474651.
177. Bähler C, Schoepfer AM, Vavricka SR, et al. Chronic comorbidities associated with inflammatory bowel disease: prevalence and impact on healthcare costs in Switzerland. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2017;29:916-25. doi:10.1097/MEG.0000000000000914.
178. Welander NZ, Olivo G, Pisanu C, et al. Migraine and gastrointestinal disorders in middle and old age: A UK biobank study. *Brain Behav*. 2021;11. doi:10.1002/brb3.2064.
179. Kim J, Lee S, Rhew K. Association between gastrointestinal diseases and migraine. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19:4018. doi:10.3390/ijerph19074018.
180. Ford S, Finkel AG, Isaacs KI. Migraine in patients with inflammatory bowel disorders. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43:499. doi:10.1097/MCG.0b013e318182d994.
181. Dimitrova AK, Ungaro RC, Lebwohl B, et al. Prevalence of migraine in patients with celiac disease and inflammatory bowel disease. *Headache*. 2013;53:344-55. doi:10.1111/head.12016.
182. Cheraghi SC, Daryani NE, Ghabaee M. A survey of migraine prevalence in patients with inflammatory bowel disease: A single centre experience. *Middle East J Dig Dis*. 2016;8:282-8. doi:10.15171/mejdd.2016.34.

183. Moisset X, Bommelaer G, Boube M, et al. Migraine prevalence in inflammatory bowel disease patients: A tertiary-care centre cross-sectional study. *Eur J Pain*. 2017;21:1550-60. doi:10.1002/ejp.1061.
184. Liu Y, Xu F, Wheaton AG, et al. The association between inflammatory bowel disease and migraine or severe headache among US adults: Findings from the National Health Interview Survey, 2015-2016. *Headache*. 2021;61:612-6. doi:10.1111/head.14083.
185. Leitão AMF, Ribeiro Junio HL, Araujo DF, et al. Neuropathy and primary headaches affect different subgroups of inflammatory bowel disease patients. *Neurol Sci*. 2021;42:935-42. doi:10.1007/s10072-020-04667-w.
186. González-Martínez A, Muro I, Quintas S, et al. Headache in patients with inflammatory bowel disease: Migraine prevalence to the Migraine Screening-Questionnaire (MS-Q) and headache characteristics. *Gastroenterol Hepatol*. Epub ahead of print 2023 May 5. doi:10.1016/j.gastrohep.2023.04.005.
187. Olfati H, Mirmosayyeb O, Hosseinabadi AM, Ghajarzadeh M. The prevalence of migraine in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Int J Prev Med*. 2023;14:66. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM\_402\_21.
188. Lossos A, River Y, Eliakim A, Steiner I. Neurologic aspects of inflammatory bowel disease. *Neurology*. 1995;45(3 Pt 1):416-21. doi:10.1212/WNL.45.3.416.
189. Hey GE, Vedam-Mai V, Beke M, Amaris M, Ramirez-Zamora A. The interface between inflammatory bowel disease, neuroinflammation, and neurological disorders. *Semin Neurol*. 2023;43(4):572-82. doi:10.1055/s-0043-1771007.
190. Gu J, Han B, Wang J. COVID-19: Gastrointestinal manifestations and potential fecal-oral transmission. *Gastroenterology*. 2020;158(6):1518-9. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.054.
191. Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit J, et al. Gastrointestinal symptoms associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A pooled analysis. *Intern Emerg Med*. 2020;15:857-9. doi:10.1007/s11739-020-02343-5.

192. Juthi RT, Sazed SA, Sarmin M, Haque R, Alam MS. COVID-19 and diarrhea: Putative mechanisms and management. *Int J Infect Dis.* 2023;126:125-31. doi:10.1016/j.ijid.2023.02.028.
193. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93(1):250-6. doi:10.1002/jmv.26232.
194. Gárate G, Pascual M, Rivero M, Toriello M, Pérez-Pereda S, González-Quintanilla V, et al. Serum calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  and  $\beta$  levels are increased in COVID-19 inpatients. *Arch Med Res.* 2023;54(1):56-63. doi:10.1016/j.arcmed.2022.12.001.
195. Gárate G, Toriello M, González-Quintanilla V, Pérez-Pereda S, Madera J, Pascual M, et al. Serum alpha-CGRP levels are increased in COVID-19 patients with headache indicating an activation of the trigeminal system. *BMC Neurol.* 2023;23(1):109. doi:10.1186/s12883-023-03136-5.
196. Laínez MJA, Vioque J, Hernández-Aguado I, et al. Prevalence of migraine in Spain. An assessment of the questionnaire's validity by clinical interview. In: Olesen J, ed. *Headache Classification and Epidemiology.* New York: Raven Press; 1994:221–225.
197. Natoli JL, Manack A, Dean B, et al. Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia.* 2010;30:599–609. doi:10.1177/0333102410372091.
198. Habib I, Mazulis A, Roginsky G, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical associations. *Inflamm Bowel Dis.* 2017;20:2493–2502. doi:10.1097/MIB.0000000000000951.
199. Faubion SS, Batur P, Calhoun AH. Migraine Throughout the Female Reproductive Life Cycle. *Mayo Clin Proc.* 2018;93:639–645. doi:10.1016/j.mayocp.2017.12.011.
200. Vetvik KG, MacGregor EA. Menstrual migraine: A distinct disorder needing greater recognition. *Lancet Neurol.* 2021;20:304–315. doi:10.1016/S1474-4422(21)00017-3.
201. Nappi RE, Tiranini L, Sacco S, De Matteis E, De Icco R, Tassorelli C. Role of Estrogens in Menstrual Migraine. *Cells.* 2022;11(8):1355. doi:10.3390/cells11081355.

202. Diaz M, Ramirez CM, Marin R, et al. Acute relaxation of mouse duodenum by estrogens. Evidence for an estrogen receptor independent modulation of muscle excitability. *Eur J Pharmacol.* 2004;501:161–78. doi:10.1016/j.ejphar.2004.09.039.
203. Heinemann A, Pieber D, Holzer P. Inhibition by female sex steroids of peristalsis in the guinea pig small intestine. *Digestion.* 2002;65:213–19. doi:10.1159/000066889.
204. Chen Q, Chitnavis V, Xiao Z, et al. Impaired G protein function in gallbladder muscle from progesterone-treated guinea pigs. *Am J Physiol.* 1998;274:283–9. doi:10.1152/ajpgi.1998.274.2.G283.
205. Lim SM, Nam CM, Kim YN, et al. The effect of the menstrual cycle on inflammatory bowel disease: a prospective study. *Gut Liver.* 2013;7:51–7. doi:10.5009/gnl.2013.7.1.51.
206. Kane SV, Reddy D. Hormonal replacement therapy after menopause is protective of disease activity in women with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1193–6. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01787.x.
207. Raffaelli B, Overeem LH, Mecklenburg J, et al. Plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) in migraine and endometriosis during the menstrual cycle. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021;8(6):1251-1259. doi:10.1002/acn3.51363.
208. Raffaelli B, Storch E, Overeem LH, et al. Sex Hormones and Calcitonin Gene-Related Peptide in Women With Migraine: A Cross-sectional, Matched Cohort Study. *Neurology.* 2023;100(17). doi:10.1212/WNL.0000000000206648.
209. Wang D, Zhao J, Wang J, et al. Deficiency of female sex hormones augments PGE2 and CGRP levels within midbrain periaqueductal gray. *J Neurol Sci.* 2014;346(1-2):107-11. doi:10.1016/j.jns.2014.07.044.
210. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K. Does inflammation have a role in migraine? *Nat Rev Neurol.* 2019;15:483–490. doi:10.1038/s41582-019-0216-y.
211. Gárate G, González-Quintanilla V, González A, et al. Serum alpha and beta-CGRP levels in chronic migraine patients before and after monoclonal antibodies against CGRP or its receptor. *Ann Neurol.* 2023;94:285-294. doi:10.1002/ana.26656.

212. Engel MA, Khalil M, Siklosi N, et al. Opposite effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in oxazolone colitis. *Dig Liver Dis.* 2012;44:24–9. doi:10.1016/j.dld.2011.09.008.
213. Holzmann B. Anti-inflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;14:268–74. doi:10.2174/1389203711314020009.
214. Li FJ, Zou YY, Ciu Y, et al. Calcitonin gene-related peptide is a promising marker in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 2013;58:686–93. doi:10.1007/s10620-012-2399-y.
215. Hoffmann J, Wecker S, Neeb L, Dirnagl U, Reuter U. Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF. *Cephalalgia.* 2012;32:659-667. doi:10.1177/0333102412451351.