

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y**  
**PSIQUIATRÍA**



**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÉTICA DE LOS  
GENES QUE CODIFICAN EL RECEPTOR GABA<sub>a</sub>  
EN LA MIGRAÑA. UN ESTUDIO DE ASOCIACIÓN  
FAMILIAR.**

**MARÍA TORIELLO SUÁREZ**

**DIRECTORES: AGUSTÍN OTERINO DURÁN**  
**JESÚS CASTILLO OBESO**



A mi familia

## **AGRADECIMIENTOS:**

En estos años me he rodeado de mucha gente a la que agradecer este trabajo, porque todos de una manera o de otra han colaborado en él. Espero no olvidarme de nadie, pero por si eso ocurre, pido perdón de antemano.

A mis directores, al Dr Oterino y al Dr Castillo. A Agustín por darme la oportunidad de dedicarme a lo que más me gusta y confiar en mí, incluso cuando yo no lo hacía. A Jesús, por siempre estar dispuesto a ayudar y por poner el punto de calma.

A Vicente, porque con compañeros así se puede ir al fin del mundo, espero que pronto tengas la oportunidad de demostrar lo buen médico que eres, te mereces todo lo mejor.

Al personal de la Consulta de Neurología, especialmente a María José y a Lola, por siempre estar dispuestas a ayudarme en todo.

A los pacientes, porque sin ellos este trabajo nunca hubiera podido llevarse a cabo, y es su bienestar el fin último de todas las investigaciones.

A mis compañeros de los laboratorios de la Escuela: Juan, Coro, Ángel, Ana Alonso, Armando, Jesús, Claudia, Elena, Ana Berja, Inés, Olga, Ana Fontalba, Lara, Eli, Dra Ramos, Adalberto, Sheila, Isabel, Jana, Alicia, Álvaro, Carol y Flor, porque de todos he aprendido algo.

A Enar y Patry, capaces de cambiar los agobios por risas sólo con sus locuras. Qué haría yo sin vosotras, pollitos míos?

A Chelo y María, por estar siempre disponibles, por ayudar a que esta tesis saliera adelante, no sólo como IPES, sino también como amigas.

A Rosa, que me ha ayudado en todos los trámites, preocupándose como una madre porque cumpliera todos los plazos y estar siempre al pendiente de todo.

A mis amigos: Rebe, David, Nati y Óscar, porque a pesar de la distancia siempre estáis cerca, siempre accesibles, siempre animando. Por dejarme formar parte de vuestra vida y sobre todo por Ibai y Hugo, esos dos regalos que me han robado el corazón.

A Josefina, por ser el enlace entre mis dos mundos, por tantos y tantos kilómetros juntas, hablando de sus niños y de mis experimentos, por su amistad y su apoyo.

A mi familia, porque es imposible encontrar mejores personas que vosotros, sois únicos; y especialmente a mi abuela Epímaca, por quererme mucho, más de lo que merecía, y estar siempre con la sonrisa puesta, no pasa un segundo sin que te eche de menos.

A mi hermano, por enseñarme que todo tiene dos puntos de vista, y a pesar de estar siempre en el lado opuesto, saber que puedo contar contigo.

A mis padres, por las cosas que se suponen y mucho más, por ser un ejemplo de sacrificio y trabajo duro, por soportarme en los días buenos y en los malos, por no quejarse jamás y por lo que no me dicen, pero me demuestran. Nunca os podré agradecer todo lo que habéis hecho por mí.

A todos gracias.

Un científico en un laboratorio no es sólo un técnico:  
es también un niño colocado ante fenómenos naturales  
que le impresionan como un cuento de hadas

Marie Curie

## ÍNDICE DE CONTENIDOS:

ÍNDICE DE CONTENIDOS:.....	I
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES:.....	II
ÍNDICE DE TABLAS:.....	III
ABREVIATURAS:.....	V
<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1.- REPASO HISTÓRICO .....	2
1.2.- CLASIFICACIÓN DE LAS CEFALEAS.....	5
1.3.- EPIDEMIOLOGÍA DE LAS CEFALEAS.....	10
1.4.- FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA .....	15
1.5.- REPERCUSIONES DE LA MIGRAÑA.....	18
1.6.- GENÉTICA DE LA MIGRAÑA .....	22
1.7.- RECEPTORES GABA.....	38
1.8.- GABA Y ENFERMEDAD .....	42
<b>2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS .....</b>	<b>45</b>
JUSTIFICACIÓN .....	46
HIPÓTESIS.....	46
<b>3.- OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<i>OBJETIVO PRINCIPAL.....</i>	<i>48</i>
<i>OBJETIVOS SECUNDARIOS .....</i>	<i>48</i>
<b>4.- MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
4.1.- CARACTERÍSTICAS LAS POBLACIONES DE ESTUDIO .....	50
4.2.- CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	51
4.3.- RECOGIDA DE DATOS .....	52
4.4.- EXTRACCIÓN DE ADN.....	53
4.5.- SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS.....	54
4.6.- SELECCIÓN DE POLIMORFISMOS (SNPs).....	56
4.7.- ESTUDIO GENOTÍPICO .....	60
4.8.- SECUENCIACIÓN .....	64
4.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
<b>5.- RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>6.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL TRABAJO.....	91
<b>7.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>92</b>
<b>8.- ANEXOS .....</b>	<b>94</b>
ANEXO I: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	95
ANEXO II: PRIMERS PARA SECUENCIACIÓN .....	99
ANEXO III: TABLAS DE RESULTADOS .....	102
ANEXO IV: BLOQUES DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO .....	129
<b>9.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>136</b>

**ÍNDICE DE ILUSTRACIONES:**

Ilustración 1: Esquema de la distribución de los individuos que participaron en el estudio familiar. (Modificado de Oterino et al 2008) ..... 50

Ilustración 2: Localización de los genes *GABRG1*, *GABRA2*, *GABRA4* y *GABRB1* en el cromosoma 4 (*locus* 4p12). ..... 55

Ilustración 3: Localización de los genes *GABRB2*, *GABRA6*, *GABRA1* y *GABRG2* en el cromosoma 5 (*locus* 5q34). ..... 55

Ilustración 4: Localización de los genes *GABRR1* y *GABRR2* en el cromosoma 6 (*locus* 6q15)... 55

Ilustración 5: Fundamento de la técnica de genotipado por sondas TaqMan. Modificado de TaqMan SNP Genotyping Assays Protocol. .... 61

Ilustración 6: Parámetros del termociclador para la PCR previa a la discriminación alélica. .... 62

Ilustración 7: Ejemplo de la interpretación de resultado de discriminación alélica. .... 63

Ilustración 8: Condiciones del termociclador para los primers 9-10, 23-24 y 55-56 de *GABRR1*. ..... 65

Ilustración 9: Condiciones del termociclador para los primers de *GABRR1* (en general) y *GABRR2*. ..... 65

Ilustración 10: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRR1*..... 70

Ilustración 11: Electroferogramas del rs371534431 donde se muestra el homocigoto TT (arriba izqda), el homocigoto CC (abajo-izqda) y el heterocigoto TC (arriba-dcha). ..... 81

Ilustración 12: Bloques de desequilibrio de ligamiento del gen *GABRA1*..... 130

Ilustración 13: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRA2*..... 130

Ilustración 14: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRA4*..... 131

Ilustración 15: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRA6*..... 131

Ilustración 16: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRB1*..... 132

Ilustración 17: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRB2*..... 132

Ilustración 18: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRG1*. ..... 133

Ilustración 19: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRG2*. ..... 133

Ilustración 20: Bloques de desequilibrio de ligamiento para *GABRP*..... 134

Ilustración 21: Bloques de desequilibrio de ligamiento para *GABRR1*. ..... 134

Ilustración 22: Bloques de desequilibrio de ligamiento para *GABRR2*. ..... 135

**ÍNDICE DE TABLAS:**

Tabla 1: Clasificación de la migraña (IHS, 2004).....	6
Tabla 2: Clasificación de la migraña (IHS, 2013).....	7
Tabla 3: Criterios diagnósticos de la Migraña sin Aura (IHS, 2004). ....	8
Tabla 4: Criterios diagnósticos de la Migraña sin Aura (ISH, 2013). ....	8
Tabla 5: Criterios diagnósticos de la Migraña con Aura típica (IHS, 2004). ....	9
Tabla 6: Criterios diagnósticos de la Migraña con Aura típica (IHS, 2013). ....	9
Tabla 7: Distribución de las principales causas de las cefaleas.....	10
Tabla 8: Prevalencia de la cefalea en la población general.....	12
Tabla 9: Prevalencia (en %) de la cefalea y la migraña a lo largo de la vida (Stovner et al, 2006). .....	14
Tabla 10: Distribución de los grupos de la muestra familiar por sexo y clínica. (Modificado de Oterino et al 2008). ....	52
Tabla 11: Protocolo extracción de ADN a partir de sangre total (Promega).....	54
Tabla 12: Listado de SNPs genotipados.....	59
Tabla 13: Volúmenes de reacción empleados para la PCR previa a la discriminación alélica. ...	61
Tabla 14: Condiciones de la PCR para secuenciación.....	64
Tabla 15: Resultados significativos <i>GABRR1</i> modelo recesivo.....	71
Tabla 16: Resultados del análisis univariante. ....	72
Tabla 17: Media de edad de las muestras de casos y controles gallega y cántabra.....	73
Tabla 18: Resultados del análisis de las muestras de casos y controles en las poblaciones de Cantabria y Galicia.....	74
Tabla 19: Resultados del Test Exacto de Fisher. ....	75
Tabla 20: Análisis genotípico de los marcadores de <i>GABRR1</i> en las muestras cántabra, gallega, y en conjunto. ....	76
Tabla 21: Resultados significativos de las combinaciones de SNPs en la población cántabra de casos y controles. ....	77
Tabla 22: Resultados significativos de las combinaciones de SNPs en la población gallega de casos y controles. ....	77
Tabla 23: Resultados significativos de las combinaciones de SNPs en la muestra de casos y controles tomada en conjunto.....	78
Tabla 24: Tabla de haplotipos con el rs9204424 según el algoritmo HAPSTAT.....	79
Tabla 25: Polimorfismos encontrados tras secuenciación del gen <i>GABRR1</i> .....	82
Tabla 26: Polimorfismos de <i>GABRR2</i> encontrados tras secuenciación del gen.....	83
Tabla 27: Listado de primers para la secuenciación de exones de <i>GABRR1</i> . ....	100
Tabla 28: Listado de primers para la secuenciación de exones de <i>GABRR2</i> . ....	101
Tabla 29: Resultados <i>GABRA1</i> modelo aditivo.....	103
Tabla 30: Resultados <i>GABRA1</i> modelo dominante. ....	103
Tabla 31: Resultados <i>GABRA1</i> modelo recesivo. ....	103
Tabla 32: Resultados <i>GABRA2</i> modelo aditivo.....	104
Tabla 33: Resultados <i>GABRA2</i> modelo dominante. ....	105
Tabla 34: Resultados <i>GABRA2</i> modelo recesivo. ....	106
Tabla 35: Resultados <i>GABRA4</i> modelo aditivo.....	107
Tabla 36: Resultados <i>GABRA4</i> modelo dominante. ....	108

## Índices

Tabla 37: Resultados <i>GABRA4</i> modelo recesivo. ....	109
Tabla 38: Resultados <i>GABRA6</i> modelo aditivo.....	110
Tabla 39: Resultados <i>GABRA6</i> modelo dominante.....	110
Tabla 40: Resultados <i>GABRA6</i> modelo recesivo. ....	110
Tabla 41: Resultados <i>GABRB1</i> modelo aditivo.....	110
Tabla 42: Resultados <i>GABRB1</i> modelo dominante.....	110
Tabla 43: Resultados <i>GABRB1</i> modelo recesivo. ....	110
Tabla 44: Resultados <i>GABRB2</i> modelo aditivo.....	111
Tabla 45: Resultados <i>GABRB2</i> modelo dominante.....	111
Tabla 46: Resultados <i>GABRB2</i> modelo recesivo. ....	111
Tabla 47: Resultados <i>GABRG1</i> modelo aditivo. ....	111
Tabla 48: Resultados <i>GABRG1</i> modelo dominante.....	111
Tabla 49: Resultados <i>GABRG1</i> modelo recesivo. ....	111
Tabla 50: Resultados <i>GABRG2</i> modelo aditivo. ....	112
Tabla 51: Resultados <i>GABRG2</i> modelo dominante.....	112
Tabla 52: Resultados <i>GABRG2</i> modelo recesivo. ....	112
Tabla 53: Resultados <i>GABRP</i> modelo aditivo.....	112
Tabla 54: Resultados <i>GABRP</i> modelo dominante.....	112
Tabla 55: Resultados <i>GABRP</i> modelo recesivo.....	112
Tabla 56: Extracto de los resultados <i>GABRR1</i> modelo aditivo.....	115
Tabla 57: Extracto de los resultados <i>GABRR1</i> modelo dominante.....	116
Tabla 58: Extracto de los resultados <i>GABRR1</i> modelo recesivo.....	127
Tabla 59: Resultados <i>GABRR2</i> modelo aditivo.....	128
Tabla 60: Resultados <i>GABRR2</i> modelo dominante.....	128
Tabla 61: Resultados <i>GABRR2</i> modelo recesivo.....	128

**ABREVIATURAS:**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**CADASIL** (del inglés, Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy): Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía.

**CGRP** (del inglés, Calcitonin Gene Related Peptide): péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

**CIE:** Clasificación Internacional de Enfermedades.

**CSD** (del inglés, Cortical Spreading Depression): depresión cortical diseminada.

**DNA** (del inglés, Deoxyribonucleic Acid): Ácido desoxirribonucleico.

**EDTA** (del inglés, Ethylenediaminetetraacetic acid): Ácido etilendiaminotetraacético.

**FBAT** (del inglés, Family Based Association Tests): Análisis de asociación de base familiar.

**GABA** (del inglés, Gamma-AminoButyric Acid): Ácido gamma-aminobutírico.

**GABAA:** Receptor GABA tipo A, ionotrópico.

**GABAB:** Receptor GABA tipo B, metabotrópico.

**GAD** (del inglés, Glutamic Acid Decarboxylase): Enzima ácido glutámico decarboxilasa.

**GWAS** (del inglés, Genome-Wide Association Study): Estudios de asociación del genoma.

**HERNS** (del inglés, Hereditary Endotheliopathy with Retinopathy, Nephropathy and Stroke): Endotelopatía hereditaria con retinopatía, nefropatía y accidente vascular.

**ICHD** (del inglés, International Classification of Headache Disorders): Clasificación internacional de las cefaleas.

**IHS** (del inglés, International Headache Society): Sociedad internacional de cefaleas.

**MCA:** Migraña Con Aura.

**MELAS** (del inglés, Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes): Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular.

**MGB** (del inglés, Minor Groove Binder): ligando de unión del surco menor.

**MHF:** Migraña Hemipléjica Familiar.

**ML:** Mililitro.

## Abreviaturas

**MSA:** Migraña Sin Aura.

**NKA:** Neurokinina A.

**OD:** Odds Ratio.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PCR** (del inglés, Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa.

**R.P.M.:** Revoluciones Por Minuto.

**SEN:** Sociedad Española de Neurología.

**SFDR** (del inglés, Spurious-Free Dynamic Range): Tasa de descubrimiento de falsa estratificación.

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNP** (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism): polimorfismo de un único nucleótido.

**SP:** Sustancia P.

**TDT** (del inglés, Transmission Disequilibrium Test): Test de transmisión del desequilibrio.

**TE:** Tris EDTA, Tris-Ácido etilendiaminotetraacético.

**TM** (del inglés, Melting Temperature): temperatura de fusión.

# **1.- INTRODUCCIÓN**

### 1.1.- REPASO HISTÓRICO

La migraña es una de las enfermedades que ha acompañado al hombre durante toda su existencia, siendo explicada a través de teorías míticas, mágicas, teológicas y científicas dependiendo del periodo de la historia.

Ya en el Neolítico (7.000 A.C.) la cefalea debía ser una entidad frecuente debido a la presencia de numerosos cráneos trepanados<sup>1</sup>, siendo ésta una práctica que se mantiene en la actualidad en algunas tribus primitivas de la Polinesia y de Kenia<sup>2</sup>. En los estudios llevados a cabo por el Campillo sobre restos de la civilización talayótica balear, se observa que el trépano solía localizarse en el hueso parietal y en el lado izquierdo<sup>3</sup>. Estas trepanaciones se realizaban con la intención de liberar el ente demoniaco que golpeaba el cerebro provocando el dolor.

Probablemente el primer escrito sobre la cefalea sea el de un poeta sumerio (3.000 A.C.) lamentándose de su mórbido y cegador dolor de cabeza<sup>4</sup>. Pero no es hasta el papiro de Ebers (1.200 A.C.) que encontramos el primer tratado médico que nos describe la cefalea, la neuralgia y los dolores punzantes, y da instrucciones a seguir para aliviarlos<sup>5</sup>. En el tratado de medicina chino Nei-King, la cefalea se explica como un desequilibrio entre las dos energías cosmológicas contrapuestas (Yin y Yan).

En el periodo griego nos encontramos tanto la visión mítica, como una más científica de la cefalea, ya que, por un lado, los escritores cuentan que Pallas Athenea nace de la cabeza de Zeus por un hachazo que recibe de Hefesto tratando de aliviar su dolor de cabeza, y por otro lado, Hipócrates (470-410 A.C.) niega la teoría sobrenatural para describir con detalle lo que hoy llamamos aura visual, que precedía a la cefalea y el vómito como método de alivio y debido a su teoría humoral aconseja la vida tranquila y las sangrías como tratamiento<sup>6</sup>.

Durante el imperio romano Areteo de Capadocia (siglo II) propone el término heterocrania, diferenciando la cefalalgia de la cefalea y enfatiza el deterioro de la calidad de vida del paciente<sup>7</sup>. Sobre esta base, Galeno de Pérgamo (siglo II) acuña el término hemicrania (del que deriva migraña) y la define como un desequilibrio entre los humores en el que predomina el humor biliar, que al llegar a la cabeza desencadena la cefalea e indicando que la hemicrania deriva de la afección de otro órgano<sup>8</sup>.

La cultura árabe-andaluza da a la hemicrania el nombre de "*xaquica*", término que mantendrá en la Península Ibérica como jaqueca y que ya utilizó Alfonso X el Sabio en sus escritos. Avicena (Ibn Sina) rebate la teoría humoral para proponer que la cefalea no se debe a

## Introducción

un “adormecimiento” de las funciones cerebrales, sino por una “exaltación” de ellas, lo que permitía que estímulos débiles como olores, ruidos o luces desencadenaran la jaqueca. Esto es un giro hacia la verdadera etiopatogenia de la enfermedad, pero la influencia de Galeno en los médicos de esta época y otras cuestiones de índole político-religioso evitaron el desarrollo de esta línea de estudio<sup>9</sup>.

En el siglo XII la abadesa Hildegarda de Bingen (1098-1180) fue capaz de describir y dibujar sus experiencias místicas que, debido a lo detallado de la explicación, hoy se puede asegurar que son consecuencia de las experiencias visuales de un aura migrañosa<sup>10</sup>.

En el siglo XVII nace la neurología. Al pionero en la neuropatología, Johan Jakob Wepfer (1620-1695), se le debe la definición de la neuralgia del trigémino, la jaqueca “basilar” y el escotoma hemianóptico. Thomas Willis (1621-1675) se centra en las enfermedades del sistema nervioso dedicando una monografía a las cefaleas haciendo una extensa clasificación, en la que por primera vez se documenta un caso de cefalea crónica diaria por abuso de medicación. Además, da las primeras pinceladas de lo que siglos más tarde se denominará teoría vascular de la cefalea<sup>11</sup>.

Samuel Tissot (1728-1797) en su tratado de Neurología, hace una completa descripción de la cefalea según su cuadro clínico. Aunque recomienda numerosos tratamientos, deja claro la ineficacia de los mismos en pacientes con cefaleas agudas<sup>12</sup>.

Gracias a los avances en el conocimiento científico médico del siglo XIX, aparecen dos escuelas: la franco-prusiana, afirma que estamos ante una alteración del sistema nervioso autónomo, frente a la escuela inglesa que apoya la hipótesis del sistema nervioso central.

Dentro de la escuela franco-prusiana, Emil du Bois-Reymond (1818-1896) afirma que la cefalea se debe a la hiperactividad sináptica, explicando las distintas fases por una vasoconstricción de la arteria temporal seguida de una vasodilatación pasiva, concluyendo que la cefalea es una enfermedad medular<sup>13</sup>. Sin embargo, esta teoría es rebatida por el experto en médula espinal Brown-Sèquard (1817-1894)<sup>14</sup>.

Mientras tanto, desde la escuela inglesa, se trata de completar la lista de síntomas de la cefalea, siendo Liveing en 1873 el que resume en un libro todas las teorías sobre la cefalea existentes hasta ese momento y siendo la base para la teoría neural de la cefalea<sup>15</sup>.

## Introducción

En este siglo el avance en el estudio de la cefalea lleva al desarrollo de nuevos tratamientos analgésicos además de los remedios clásicos, algunos de los cuales podrían ser útiles en el caso de cefaleas leves.

En el siglo XX, surge la teoría vascular que completa Harold Wolff (1898-1972), quien afirma que la cefalea comienza con una vasoconstricción y continúa con una vasodilatación arterial<sup>16</sup>. Esta teoría se ve reforzada con el desarrollo de la ergotamina, que es capaz de constreñir las arterias a la vez que alivia el dolor y, en estudios con pacientes, en los que al azar se les administró el fármaco o placebo, demostrando una mayor eficacia del tratamiento frente al placebo<sup>17</sup>. La teoría vascular necesitará algunos cambios, ya que la ergotamina también puede causar cefalea crónica y resistencia a otros fármacos.

En este siglo la mejora en la tecnología disponible por los médicos e investigadores da lugar a la aparición de publicaciones sobre nuevos descubrimientos que apoyan tanto la teoría vascular como la teoría neural o incluso que consiguen unificar estas dos vías. Aparecen nuevos conceptos, como “depresión cortical propagada”<sup>18</sup> y nuevos datos diagnósticos que no se pueden comparar debido a la falta de una homogeneidad entre las distintas asociaciones. Todo ello hizo necesario una clasificación que aunara todos los criterios diagnósticos, por lo que la Sociedad Internacional de Cefaleas en 1988 elaboró una Clasificación de Cefaleas y Algias Faciales<sup>19</sup>, que se ha ido actualizando periódicamente, con el fin de permitir un mejor diagnóstico de los pacientes y con ello poder aplicar el tratamiento más adecuado para cada caso<sup>20</sup>.

## **1.2.- CLASIFICACIÓN DE LAS CEFALEAS**

En 1956, el comité “Ad Hoc” se reunió en Estados Unidos, para dar lugar a la que se considera primera Clasificación de las Cefaleas<sup>21</sup>. Esta clasificación no se aceptó hasta los años sesenta, y sólo de manera parcial ya que no contenía criterios diagnósticos definidos, lo que permitía la interpretación de la misma por parte del observador e impidió su aceptación internacional.

En 1985, la Sociedad Internacional de Cefaleas (IHS) formó un nuevo comité liderado por J. Olesen, el cual desarrolló y publicó en 1988 la primera Clasificación Internacional de Cefaleas, que incluía criterios diagnósticos para las cefaleas, neuralgias y dolores faciales<sup>19</sup>. Esta Clasificación (ICHD-I) fue reconocida por la Federación Mundial de Neurología, por la OMS, y sus criterios se incluyeron en la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10). En España, el Grupo de Cefaleas de la Sociedad Española de Neurología (SEN), tradujo al español esta clasificación en el año 1992, así como las distintas actualizaciones que fueron apareciendo<sup>22, 23</sup>.

En esta Clasificación las Cefaleas se reúnen en once grupos mayores. Los grupos 1-4 recogen las cefaleas primarias, mientras que los grupos 5-11 corresponden a cefaleas secundarias. Los criterios IHS son fundamentalmente clínicos y por lo tanto dependen de la historia clínica y la exploración neurológicas. A pesar de su carácter descriptivo, los criterios IHS permiten un diagnóstico positivo de las cefaleas primarias, y más concretamente de la migraña, en la gran mayoría de los pacientes, sin necesidad de estudios complementarios. Ya en este siglo, ha aparecido una nueva versión de esta clasificación (ICHD-II)<sup>20</sup>, con sólo pequeñas modificaciones en cuanto a las cefaleas primarias. Los criterios diagnósticos de las principales variedades de migraña según la Clasificación de 2004 se resumen en las tablas Tabla 1, Tabla 3, Tabla 5.

Finalmente en 2013 apareció la versión Beta de la nueva Clasificación de las Cefaleas (ICHD-III)<sup>23</sup>. Los cambios que introduce no son trascendentales a la hora de inferir un diagnóstico de migraña, si bien era necesaria una revisión y ampliación de ciertos puntos. La nueva categorización de la migraña se muestra en las tablas Tabla 2, Tabla 4, Tabla 6.

1. Migraña
  - 1.1. Migraña sin aura
  - 1.2. Migraña con aura
    - 1.2.1. Aura típica con cefalea migrañosa
    - 1.2.2. Aura típica sin cefalea migrañosa
    - 1.2.3. Aura típica sin cefaleas
    - 1.2.4. Migraña hemipléjica familiar
    - 1.2.5. Migraña hemipléjica esporádica
    - 1.2.6. Migraña basilar
  - 1.3. Síndromes periódicos en la infancia precursores de migraña
    - 1.3.1. Vómitos cíclicos
    - 1.3.2. Migraña abdominal
    - 1.3.3. Vértigo paroxístico benigno de la infancia
  - 1.4. Migraña retiniana
  - 1.5. Complicaciones de la migraña
    - 1.5.1. Migraña crónica
    - 1.5.2. Estado de mal migrañoso
    - 1.5.3. Aura persistente sin infarto
    - 1.5.4. Infarto migrañoso
    - 1.5.5. Crisis epiléptica desencadenada por migraña
  - 1.6. Migraña probable
    - 1.6.1. Migraña sin aura probable
    - 1.6.2. Migraña con aura probable
    - 1.6.3. Migraña crónica probable

**Tabla 1: Clasificación de la migraña (IHS, 2004).**

1. Migraña
1.1. Migraña sin aura
1.2. Migraña con aura
1.2.1. Migraña con aura típica
1.2.1.1. Aura típica con cefalea
1.2.1.2. Aura típica sin cefalea
1.2.2. Migraña con aura del tronco encefálico
1.2.3. Migraña hemipléjica
1.2.3.1. Migraña hemipléjica familiar (MHF)
1.2.3.1.1. Migraña hemipléjica familiar de tipo 1 (MHF1)
1.2.3.1.2. Migraña hemipléjica familiar de tipo 2 (MHF2)
1.2.3.1.3. Migraña hemipléjica familiar de tipo 3 (MHF3)
1.2.3.1.4. Otros tipos de migraña hemipléjica familiar
1.2.3.2. Migraña hemipléjica esporádica
1.2.4. Migraña retiniana
1.3. Migraña crónica
1.4. Complicaciones de la migraña
1.4.1. Estado migrañoso
1.4.2. Aura persistente sin infarto
1.4.3. Infarto migrañoso
1.4.4. Crisis epiléptica desencadenada por aura migrañosa
1.5. Migraña probable
1.5.1. Migraña sin aura probable
1.5.2. Migraña con aura probable
1.6. Síndromes episódicos que pueden asociarse a la migraña
1.6.1. Trastorno gastrointestinal recurrente
1.6.1.1. Síndrome de vómitos cíclicos
1.6.1.2. Migraña abdominal
1.6.2. Vértigo paroxístico benigno
1.6.3. Tortícolis paroxístico benigno

**Tabla 2: Clasificación de la migraña (IHS, 2013).**

## Introducción

- A. Al menos cinco crisis que cumplan los criterios B-D.
- B. Crisis de cefalea que duran entre 4 y 72 horas (no tratadas o tratadas sin éxito).
- C. La cefalea tiene dos o más de las siguientes características:
  - C.1. Localización unilateral.
  - C.2. Calidad pulsátil.
  - C.3. Dolor de intensidad moderada o intensa.
  - C.4. Se agrava con el ejercicio físico.
- D. Durante la cefalea se dan una o más de las siguientes características:
  - D.1. Náuseas o vómitos.
  - D.2. Fotofobia y fonofobia.
- E. No atribuible a otro trastorno.

**Tabla 3: Criterios diagnósticos de la Migraña sin Aura (IHS, 2004).**

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

**Tabla 4: Criterios diagnósticos de la Migraña sin Aura (ISH, 2013).**

## Introducción

- A. Al menos dos crisis que cumplan los criterios B-D.
- B. El aura consiste en uno o más de los siguientes criterios, pero sin debilidad motora:
  - B.1. Síntomas visuales totalmente reversibles, incluidos las características positivas o negativas.
  - B.2. Síntomas sensitivos totalmente reversibles, incluidos las características positivas o negativas.
  - B.3. Trastorno del habla difásico totalmente reversible.
- C. Al menos dos de los siguientes:
  - C.1. Síntomas visuales ipsilaterales o síntomas sensoriales unilaterales o ambos.
  - C.2. Al menos un síntoma del aura se desarrolla gradualmente durante cinco o más minutos, o aparecen síntomas diferentes al aura en sucesión a lo largo de cinco o más minutos.
  - C.3. Cada síntoma dura entre 5 y 60 minutos.
- D. Cefalea que cumple los criterios B a D para la migraña sin aura que comienza durante el aura o sigue al aura en los 60 minutos siguientes.
- E. No atribuible a otro trastorno.

**Tabla 5: Criterios diagnósticos de la Migraña con Aura típica (IHS, 2004).**

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

**Tabla 6: Criterios diagnósticos de la Migraña con Aura típica (IHS, 2013).**

### 1.3.- EPIDEMIOLOGÍA DE LAS CEFALEAS

Hasta la aparición en 1988 de la Clasificación de las Cefaleas llevada a cabo por la IHS, resultaba muy difícil el realizar un estudio epidemiológico de esta enfermedad, ya que no existía homogeneidad de criterios a la hora de diagnosticar las cefaleas.

A pesar de ello existen otros problemas que dificultan este tipo de estudios. Entre ellos destaca el hecho de que siendo la cefalea uno de los motivos más frecuentes de consulta, un elevado porcentaje de pacientes no visita al médico. Del mismo modo, la cefalea es variable dependiendo del paciente, e incluso un mismo paciente puede sufrir varios tipos de cefalea según el episodio. A todo esto se une la ausencia en la actualidad de marcadores biológicos o de neuroimagen que diferencien las distintas clases de cefaleas.

El estudio que se toma como referencia en cuanto a la distribución de los distintos tipos de cefalea según criterios IHS fue el realizado por Rasmussen y Olesen en 1992 en la población danesa (Tabla 7).

Cefaleas primarias	Porcentaje
Migraña sin aura	9%
Migraña con aura	6%
Cefalea de tensión episódica	63%
Cefalea de tensión crónica	3%
Cefalea punzante idiopática	2%
Cefaleas secundarias	Porcentaje
Cefalea por resaca	72%
Cefalea por fiebre	63%

**Tabla 7: Distribución de las principales causas de las cefaleas.**

La prevalencia de una enfermedad es el número de casos de una enfermedad en la población general en un tiempo determinado. Existen numerosos estudios que calculan la prevalencia de la cefalea en distintos países, pero, aunque en muchos casos los resultados son similares, se conoce que existen diferencias atribuibles a factores culturales, dietéticos, climáticos y genéticos. Por otra parte estas diferencias también quedan explicadas por las distintas metodologías utilizadas en estos estudios, que varía de unos a otros, no sólo en cuanto al periodo de estudio de la cefalea sino también porque los datos se obtienen a partir de grupos poblacionales sesgados. Por tanto, es difícil comparar los distintos resultados obtenidos<sup>24</sup>.

## Introducción

Si analizamos los resultados de los estudios epidemiológicos que se muestran en la Tabla 8 podemos comprobar que salvo en el estudio realizado por Okumura et al<sup>25</sup> en Japón, el porcentaje de la población que padece cefalea es superior al 29%, lo que demuestra la alta frecuencia de esta patología en nuestra sociedad.

## Introducción

Autor (País, Año)	Tamaño muestral	Porcentaje de pacientes con cefalea	Porcentaje de pacientes con cefalea crónica diaria	Porcentaje de pacientes con cefalea tensional	Edad de los participantes en el estudio
Okumura (Japón, 2010) <sup>25</sup>	4693	8,9%		30,8%	
Sakai (Japón, 2002) <sup>26</sup>	4029	55,6%			>15
Takehima (Japón, 2004) <sup>27</sup>	4795	34%			>20
Lanteri-Minet (Francia, 2003) <sup>28</sup>	1481		2,98%		>15
Wang (Taiwán, 2000) <sup>29</sup>	3377	62%			15-70
Zivadinov (Croacia, 2001) <sup>30</sup>	3794	65,2%			15-65
Boardman (Inglaterra, 2003) <sup>31</sup>	2662				>18
Castillo (España, 1998) <sup>32</sup>	1883	77%	4,7%	2,2% (crónica)	>14
D`Alessandro (San Marino, 1988) <sup>33</sup>	1144	46,16%			7-71
Dahlöf (Suecia, 2001) <sup>34</sup>	1668	62,11%			18-74
Hagen (Noruega, 2000) <sup>35</sup>	51383	37,7%	1,5%		>20
Lampl (Austria, 2003) <sup>36</sup>	997	49,4%			>15
Mitsikostas (Grecia, 1996) <sup>37</sup>	3501	29%	15%		15-75
Rasmussen (Dinamarca, 1991) <sup>38</sup>	975	96%		78%	25-64
Láinez (España, 1994) <sup>39</sup>	2231	87%			16-65

**Tabla 8: Prevalencia de la cefalea en la población general.**

## Introducción

El único estudio epidemiológico que ha analizado en España la cefalea a lo largo de la vida ha sido el de Láinez et al (1994)<sup>39</sup>. Hasta un 86,7% de la población refiere haber sufrido algún tipo de cefalea a lo largo de su vida; el 12% migraña (17% de las mujeres y 8% de varones). Otro estudio, también en nuestro país, observó que cerca de un 80% de la población aqueja cefalea (Pascual 1995)<sup>40</sup>. Posteriormente, Castillo et al (1998)<sup>41</sup>, en un estudio poblacional dirigido al estudio de la cefalea crónica diaria, concluyó que un 77% de la cohorte refería sufrir cefaleas, la mayor parte de ellas de tipo tensional episódica. En este estudio, la cefalea crónica fue 9 veces más frecuente en mujeres que en varones con una prevalencia global de 4,7%, 1,0% para varones y 8,7% para las mujeres. Los casos con migraña crónica representaron el 50% aproximadamente. Posteriormente, en un trabajo de revisión, como parte de una iniciativa del “European Brain Council” dirigida a estimar los costes por trastornos cerebrales, concluyó que, en Europa, un 51% de los individuos aqueja cefalea, 14% migraña, y cefalea crónica (con el criterio de más de 15 días de dolor al mes, al menos durante 3 meses) un 4%. En general, la migraña y en menor grado la cefalea, son más frecuentes en la edad más productiva de la vida adulta (20 a 50 años).

Centrándonos en la migraña, las diferencias observadas en los estudios realizados dependen de variaciones en la metodología, modo de reclutamiento de los casos, criterios usados (fundamentalmente hasta la primera clasificación de las cefaleas en 1988), culturales (quizás Japón aporte cifras excesivamente bajas por este motivo), sesgo de selección, y nivel de participación de las poblaciones bajo estudio. No obstante, la mayoría de los estudios analizados en Europa coinciden en que la migraña tiene una prevalencia en torno a 15% de la población, con un predominio 2:1 de la migraña sin aura frente a la migraña con aura (9% y 6% en Rasmussen y Olesen 1992). Apenas existen estudios al respecto en la Europa del Este. De los publicados posteriormente a 2004 (segunda revisión de la clasificación de la IHS), la prevalencia en Europa de la migraña varía desde 9,6% en Hungría, hasta el 24,6% en Suiza. En EEUU, las cifras son muy similares a las de Europa (Patel et al 2006)<sup>42</sup> y en Latinoamérica, algo inferiores (Morillo et al 2005)<sup>43</sup>, con un global de prevalencia de migraña de 9,3%.

Sea como fuere, las cifras de consenso para nuestro medio son muy similares a las de Europa (Stovner et al 2006)<sup>44</sup>, con un predominio de mujeres frente a varones en los adultos con edades comprendidas entre 14-65 años.

## Introducción

	País	Muestra (n)	Rango de edad (años)	Cefalea			Migraña		
				Hombres	Mujeres	Total	Hombres	Mujeres	Total
Adultos	Croacia <sup>30</sup>	3.794	15-65				14,8	22,9	19
	Dinamarca <sup>38</sup>	740	25-64	93	99	96	8	25	16,1
	Dinamarca <sup>45</sup>	4.061	40				12	24	18
	Finlandia <sup>46</sup>	200	>15			91			
	Francia <sup>28</sup>	10.585	>15						
	Alemania <sup>47</sup>	4.061	>18			71,4	22	32	27,5
	Países Bajos <sup>48</sup>	6.491	20-65				13,3	33	16,3
	España <sup>39</sup>	2.231	16-65			86,7	8	17	12
	Suecia <sup>49</sup>	722	40-74					31	
	Reino Unido <sup>31</sup>	1.662	>18	90,2	94,4	92,6			
Niños y adultos	Francia <sup>50</sup>	4.204	5-65			35	6,1	17,6	12,1
	Turquía <sup>51</sup>	947	>7				7,9	17,1	12,5
	Reino Unido <sup>52</sup>	727	>7	35,3	46,2				
	Japón <sup>53</sup>	4029	>15			55,6	6,6	13	8,4
	Japón <sup>27</sup>	5740	>20				2,3	9,1	6
	China <sup>29</sup>	3377	>15				4,6	14,2	9,7
	San Marino <sup>33</sup>	1144	>7	3,5	5,9	4,7			
	Grecia <sup>37</sup>	3501	15-75	19	40	29			
	Noruega <sup>35</sup>	51383	>20	29,6	45,7	37,7	7,5	15,6	11,6
	Austria <sup>36</sup>	997	>15	43,6	54,6	49,4	6,1	13,8	10,2
	Estados Unidos <sup>54</sup>	29727	>12				6,5	18,2	12,6
	Estados Unidos <sup>55</sup>	20468	>12				5,7	17,6	12,1
Niños y adultos	Finlandia <sup>56</sup>	3.580	8-9			36,5	3	2,3	2,7
	Suecia <sup>57,58</sup>	8.993	7-15	58	59,3	58,7			

**Tabla 9: Prevalencia (en %) de la cefalea y la migraña a lo largo de la vida (Stovner et al, 2006).**

En España, en 2014 se llevó a cabo una revisión de una serie de encuestas realizadas en la primera década del siglo XXI con el fin de comprobar si existía variación en la prevalencia de la migraña a lo largo del tiempo (Fernández de las Peñas et al 2014)<sup>59</sup>. Dicho trabajo dio como resultado un aumento en la prevalencia de la migraña desde 2003 a 2012 pasando de un 6.54% a un 9.69% algo que se correlaciona con estudios similares llevados a cabo en otros países europeos como Dinamarca (Lyngberg et al 2005)<sup>60</sup> y Noruega (Linde et al 2011)<sup>61</sup>.

## 1.4.- FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA

Aunque la patogénesis de la migraña permanece desconocida existen varios aspectos que se sabe a ciencia cierta que tienen lugar en alguna de las fases del ataque de migraña, si bien la completa génesis del mismo no ha sido descifrada todavía.

La migraña es un trastorno neurovascular que comprende 4 fases:

- **Fase prodrómica:** Los pródromos no son equivalentes al aura. Hay dos tipos: los pródromos no evolutivos que aparecen 6-48 horas antes de desencadenarse el dolor, y los evolutivos que suceden en las 6 horas anteriores al episodio doloroso. Los pródromos, también denominados síntomas premonitorios, son una variedad de síntomas neurológicos, autonómicos o sistémicos<sup>62</sup>. El hecho de ser de carácter anticipatorio del ataque doloroso sugiere que se deben a la activación cortical límbica e hipotalámica.

- **Fase de aura:** El aura es un fenómeno presente en el 15-20% de los migrañosos<sup>63</sup>. Se caracteriza porque los síntomas se instauran de manera progresiva, durando en la mayoría de los casos entre 10-30 minutos.

Está asociada a una reducción de flujo cerebral en la sustancia gris de regiones posteriores del hemisferio contra-lateral al campo afectado.

El aura migrañosa más frecuente es el aura visual, siendo, en la mayoría de los casos, una especie de escotoma paracentral de bordes festoneados que se va expandiendo a un promedio de 2-3mm/minuto. La depresión cortical propagada (CSD siglas en inglés de Cortical Spreading Depression) ocurre cuando la corteza cerebral es estimulada por señales químicas o eléctricas, y consiste en una despolarización gradual de la neuroglia, que se propaga a unos 3-4mm/minutos<sup>18</sup>. El estudio en animales de laboratorio permitió observar que primero se produce una activación neuronal y después una dilatación vascular secundaria, con un incremento del flujo del 300%<sup>64</sup>. Esta hiperemia es seguida de una onda de depresión de la actividad neuronal acompañada de una oligoemia (no llegando a causar isquemia). Estos procesos se inician y propagan por la sustancia gris y no siguen ningún vaso sanguíneo concreto, deteniéndose al alcanzar los surcos cerebrales mayores.

Estas características fisiopatológicas de la CSD están relacionadas con los elementos constitutivos del aura visual. Es por todo ello que nos lleva a considerar al CSD como la causante del aura en la migraña<sup>65,66</sup>.

## Introducción

Otros tipos de aura bastante frecuentes son la sensitiva (con hormigueos y pérdida de sensibilidad) y la disfásica (alteración del lenguaje). La menos frecuente es el aura hemipléjica.

En los pacientes que presentan migraña sin aura, se baraja la posibilidad de que el CSD suceda en regiones silentes del cerebro y que por ello el paciente no tenga ninguna manifestación física, como sucede en los migrañosos con aura<sup>67</sup>.

- **Fase dolorosa:** La duración de esta fase dolorosa (sin tratamiento), está entre las 4 y 72 horas. Suele empezar con una molestia débil que va aumentando en intensidad. En casi la mitad de los pacientes el dolor tiene un predominio hemicraneal afectando a las sienas o a la zona de alrededor del ojo. Dependiendo de los pacientes, la descripción del dolor varía, viéndose empeorado, en muchos casos, por la luz, ruido, olores, movimiento, etc.

De los conocimientos obtenidos hasta ahora, la génesis del dolor comprendería distintas etapas:

Activación de un generador central posterior al CSD, situado en el rafe dorsal del tronco encefálico o en el núcleo caudal del trigémino, contralateral al lado del dolor, activado por el óxido nítrico.

Estimulación antidrómica del sistema trigémino-vascular, originando vasodilatación meníngea que lleva a la activación de las terminaciones nerviosas sensoriales trigeminales, que transmiten impulsos dolorosos al núcleo caudalis del tronco cerebral y la liberación de péptidos vasoactivos (SP, NKA, CGRP) que producen vasodilatación e inflamación neurogénica<sup>68,69</sup>. Este tipo de inflamación sensibiliza las neuronas del asta dorsal provocando un incremento de la respuesta a estimulación mecánica y térmica de los campos receptivos cutáneos, en los que desciende el umbral de respuesta y se incrementa la magnitud de la misma; lo que puede explicar la hipersensibilidad que padecen muchos pacientes<sup>70</sup>.

Hay una estación intermedia de los impulsos dolorosos entre los nervios sensoriales periféricos activados y las neuronas sensoriales de segundo orden del complejo trigémino-cervical, con sensibilización e intensificación del dolor migrañoso mediante el cual el ataque progresa y aumenta la sensibilidad para la convergencia de estímulos extracraneales produciéndose un estado final de hiperexcitación.

El núcleo trigeminal gestiona las señales dolorosas hacia centros superiores del tálamo y la corteza y hacia los núcleos adyacentes del tronco cerebral, como el tracto solitario que inicia las náuseas, vómitos y otros fenómenos autonómicos.

## Introducción

Una parte de estos procesos parece estar mediada por los receptores de serotonina presentes en el músculo liso y el endotelio de los vasos meníngeos (vasoconstrictores y vasodilatadores respectivamente).

- **Fase postdrómica:** una vez disminuye o desaparece el dolor, el migrañoso puede sentirse cansado y dolorido, con una sensación como de resaca que puede durar uno o dos días, son los denominados síntomas resolutorios.

## **1.5.- REPERCUSIONES DE LA MIGRAÑA.**

### **Repercusión económica:**

Cualquier enfermedad que afecta a un individuo tiene unas repercusiones tanto en el paciente como en su entorno. Al ser la migraña una enfermedad crónica con manifestaciones episódicas, el migrañoso tiene una serie de limitaciones tanto en su vida personal, como laboral, ocasionando gastos, tanto en consumo de recursos sanitarios, como por la pérdida económica que se deriva del bajo o nulo rendimiento en su trabajo.

El coste directo de una enfermedad, hace referencia al gasto ocasionado por el uso de recursos sanitarios. Esto incluye: visitas al médico (tanto para el diagnóstico como para su tratamiento), visitas a los servicios de urgencias, procedimientos utilizados para llegar al diagnóstico y medicación consumida.

Pero la migraña no sólo ocasiona un gasto al sistema sanitario, sino que también provoca una reducción de la funcionalidad y pérdida de la productividad del que la sufre en su ámbito laboral, con grave repercusión económica para las empresas. A esto se denomina costes indirectos.

Las crisis de migraña son, en la mayoría de los individuos, más frecuentes en la edad más productiva del paciente, de modo que las pérdidas ocasionadas con cada episodio para las empresas y para su vida misma son importantes.

Dentro de la Unión Europea se ha llevado a cabo el proyecto “Cost of brain disorders in Europe”<sup>71</sup> en el que, aparte de la migraña se tratan otro tipo de enfermedades relacionadas de alguna manera con el cerebro. La Agencia de Salud Pública de la Unión Europea es uno de los impulsores del estudio “Eurolight”, que proporciona información acerca de la cefalea tensional, la cefalea crónica y la migraña<sup>72</sup>. En este proyecto participan Alemania, Austria, España, Francia, Irlanda, Italia, Lituania, Luxemburgo, los Países Bajos y Reino Unido.

Estos estudios hacen una valoración de los días de trabajo perdidos por migraña, así como la eficiencia laboral de los trabajadores en los días que sufren de migraña. Todos esos días de trabajo perdidos se traducen en dinero, calculando así las pérdidas económicas que genera la migraña.

En el proyecto “Cost of brain disorders” el coste económico anual de la migraña, en los 6 países europeos estudiados, va desde los 80€/persona de Suecia<sup>73</sup>, a los 900€/persona de Alemania<sup>74</sup>. Estas variaciones pueden deberse a la distinta metodología de cálculo empleada

## Introducción

en cada país y los diferentes años que se toman como referencia. En este estudio el coste estimado por España es de 111€ paciente/año y la media europea estaría en torno a los 590€ paciente/año, con una media de días perdidos al año de 2,5 y un 65% de eficiencia los días que el migrañoso acude a su trabajo con dolor, lo que llevaría a un total de 4,1 días perdidos por paciente/año.

Los primeros resultados del estudio “Eurolight” publicados pertenecen a Luxemburgo, donde hay 38.300 casos de migraña obteniéndose que los costes directos sanitarios fueron de 7€ por paciente al año, y 28€ por paciente al año en el caso de los costes indirectos<sup>75</sup>.

Pero no son sólo estos los estudios sobre el coste económico llevados a cabo en Europa.

En 1988, un estudio Holandés calculó el coste de la migraña en 270 millones de dólares al año, desglosando esta cantidad en 53 millones por asistencia médica, 106 millones por ausencia en el trabajo y 111 millones de dólares por pérdidas de productividad<sup>76</sup>, destacando que las mayores pérdidas tienen que ver con el rendimiento de los migrañosos en el momento de las crisis, y no porque acudan a los servicios médicos para tratar su problema.

Posteriormente Göbel en el año 2000 calcula el coste de la migraña en la Unión Europea aproximadamente 20.000 millones de euros al año o lo que es lo mismo, 17.400 millones de dólares<sup>77</sup>.

En Noruega, el estudio “HUNT” concluye que los individuos con cefalea pierden 2,5 días al año de trabajo más que los individuos sanos, y los migrañosos 4,4 días al año<sup>78</sup>. Además, este estudio encontró una relación entre el bajo nivel socioeconómico y la migraña<sup>79</sup>. Este resultado viene a reforzar la teoría expuesta por otros estudios realizados en Norteamérica<sup>55</sup>, pero que no se ven refrendados por otros estudios más pequeños llevados a cabo en otros países europeos.

Estudios similares llevados a cabo en Suecia indican que el coste de la migraña es de unos 100€ al año por cada individuo que la padece, siendo de 2 a 6 los días que se pierden al año por cefaleas, y de 1,5 a 4,2 los días que se pierden en el caso de los migrañosos<sup>80</sup>.

Hu et al en Estados Unidos hacen una diferenciación por sexo, analizando una población de edad comprendida entre 20 y 64 años, cuya prevalencia de la migraña es de un 7% en hombres y un 20% en mujeres. La media de crisis por año en esta población fue de 34 días en el caso de los hombres y 37 días en las mujeres, siendo 4 los días de reposo anuales

necesitados por los hombres y unos 6 en el caso de las mujeres. Con estos datos se estimó un gasto total de 14.574 millones de dólares, repartidos en 2.853 millones en los hombres y 11.721 millones en las mujeres. De estas cantidades, sólo un 8% serían costes asociados a la atención primaria de los pacientes<sup>81</sup>.

### **Repercusión sobre la calidad de vida:**

Clásicamente el impacto de una enfermedad sobre el individuo se medía por la morbilidad, pero estamos ante una enfermedad que no provoca un incremento en el riesgo de muerte del individuo que la sufre, ni tampoco, aparentemente, conlleva secuelas físicas, lo que no implica que afecte al migrañoso hasta el punto de provocar un descenso en su capacidad de disfrutar de la vida.

En los años 50 la Organización Mundial de la Salud amplió la clásica definición que se tenía de la salud y que la consideraba sólo como la ausencia de enfermedad, llevándola a la definición aceptada actualmente en la que se indica que es un estado de bienestar físico, psíquico y social. De este modo llega a colocar a la migraña dentro de su listado de enfermedades incapacitantes para la vida cotidiana<sup>82</sup>, incorporando distintas funciones, incluyendo la social.

Turner-Bowker destaca que es comparable el impacto de la migraña en el individuo con la experiencia de pacientes diabéticos, hipertensos, o que hayan sufrido ataques cardíacos congestivos<sup>83</sup>.

En un estudio realizado en Michigan se concluye que existe una relación entre la migraña y los trastornos psiquiátricos, como la depresión mayor (9% sanos vs 22% MSA y 32% MCA), las crisis de pánico (10 veces más en migrañosos que en no migrañosos) y la ansiedad (21% en no migrañosos vs 54% en migrañosos), así como con los intentos de suicidio en pacientes migrañosos, llegando a una odds ratio de 3.0 en el caso de los migrañosos con aura<sup>84</sup>.

Además de estos trastornos de tipo psiquiátrico y valorables por un médico existen otros trastornos ocasionados por la migraña que afectan a la vida del paciente, como la pérdida de oportunidades en formación profesional, puesta al día, o pérdida de mejoras laborales, ya que ocasiona un bajo rendimiento escolar y limita las capacidades del individuo durante el periodo que dura la crisis migrañosa. Debemos incluir aquí las relaciones personales del individuo, ya que la fase dolorosa suele ir asociada con aislamiento del paciente, impidiendo el normal comportamiento hacia las personas que le rodean. Pero no sólo eso,

## Introducción

incluso en el periodo intercrítico, en algunos casos, éste va acompañado de un estado de ansiedad y temor hacia una futura crisis, lo que impide al individuo la realización de actividades en su tiempo de ocio.

Para determinar el estado emocional, los días que la migraña le impidió realizar actividades cotidianas y la calidad de vida del individuo migrañoso se suelen emplear distintas escalas y cuestionarios como el SF-36 (y sus variantes resumidas), HIT-6, MSQ-LI, MIDAS, etc.

## 1.6.- GENÉTICA DE LA MIGRAÑA

El componente genético en el caso de las migrañas está totalmente comprobado, aunque el tamaño del efecto de un alelo en particular sea discreto. Los estudios de gemelos han ayudado a conocer la contribución de la herencia en la migraña. Estos estudios comparan la tasa de concordancia, o probabilidad de que los dos hermanos tengan el mismo fenotipo, entre gemelos monozigóticos (idéntico genotipo) y gemelos dizigóticos (comparten el 50% del genotipo, como cualquier pareja de hermanos). Tanto en los estudios de migraña con aura como sin aura llevados a cabo con gemelos se demuestra que es un trastorno heredable, ya que la tasa de concordancia en gemelos monozigóticos supera a la de dizigóticos, aunque también se observa que los factores ambientales están implicados en el trastorno, ya que la tasa de concordancia de gemelos monozigóticos es inferior al 100%. En una muestra de gemelos danesa se comprobó que el riesgo de migraña con aura entre gemelos monozigóticos era del 50% mientras que en dizigóticos era del 21%, siendo la prevalencia entre los gemelos dizigóticos muy similar a la de parejas de hermanos no gemelos. La tasa de concordancia en este estudio era significativamente más elevada en gemelos monozigóticos (34%) en comparación con los dizigóticos (12%)<sup>85</sup>. En otro estudio llevado a cabo con otra muestra de gemelos daneses la tasa de concordancia para la migraña sin aura en los gemelos monozigóticos fue del 28% mientras que la de dizigóticos es 18%. Aunque en este caso el factor genético está claro, se recortó la diferencia entre ambos grupos de gemelos<sup>86</sup>.

Los estudios familiares mostraron que el riesgo familiar de migraña está incrementado cuando existían otros familiares afectados. El riesgo de padecer migraña para individuos con parientes migrañosos es un 50% más probable que en una familia de controles sanos, dando cuenta de que el riesgo relativo era mayor en el caso de la MCA comparado con la MSA (1,95 vs 1,42), si bien no resultó significativo para la muestra estudiada. Otros parámetros estudiados son el riesgo relativo de padecer migraña dependiendo del grado de gravedad de la migraña de los familiares (haciendo una escala en la que se tiene en cuenta la incapacidad de realizar tareas de rutina, tales como trabajo, estudios, etc). Según este parámetro, los individuos de familias cuyos miembros tienen migrañas poco graves, su riesgo relativo no se ve incrementado respecto a familias de controles (1,20). Sin embargo en las familias de migrañosos graves el riesgo relativo aumenta hasta alcanzar un 2,7<sup>87</sup>.

A pesar de todos estos indicios, no se ha encontrado todavía ningún gen que claramente predisponga a padecer migraña común, por lo que cabe suponer que la migraña es un trastorno multifactorial poligénico, que está influenciado por múltiples genes y factores

ambientales. Los estudios de heredabilidad de la migraña muestran que la migraña está influenciada por factores ambientales. Son estos factores los que pueden afectar a la expresión fenotípica del trastorno y como consecuencia afectar al diagnóstico, lo que resulta crítico a la hora de hacer un estudio genético de la enfermedad. Estas observaciones obligan a tener que considerar las interacciones gen-gen y gen-ambiente, que dan lugar a la variabilidad existente entre los individuos que padecen migraña.

### Genes candidatos para la migraña:

Los estudios de asociación han servido para analizar genes candidatos para este trastorno. Estos genes codifican moléculas que juegan algún papel dentro de la fisiopatología de la migraña y de los que sería probable esperar que existieran variantes alélicas que alteraran la funcionalidad del producto del gen y fueran un factor de riesgo para la migraña o tuvieran un efecto protector sobre la misma. Algunos de estos estudios se muestran a continuación:

La serotonina (5-HT) se ha propuesto como un candidato neurológico para la migraña, además de otros trastornos comórbidos. Este neurotransmisor participa en la nocicepción y el procesamiento de la información, aunque se desconoce su implicación real en la migraña. Se han estudiado varios genes relacionados con el sistema serotoninérgico con resultados controvertidos, y por tanto, no concluyentes. Los genes relacionados con la serotonina analizados son algunos de sus receptores (*5-HT2A*<sup>88,89</sup>, *5HT1B/1D*<sup>90</sup>, *5-HT2C*<sup>91,92</sup>), un transportador (*SLC6A4*<sup>93,94,95,96</sup>) y otros genes cuyos productos están implicados en su ruta de síntesis como la triptófano hidroxilasa (*TPH2*)<sup>97,98</sup> o la monoaminoxidasa (*MAOA*)<sup>99</sup>.

Existen procesos relacionados con el sistema dopaminérgico que ocurren antes o durante la crisis de migraña (náusea, vómito, sueño, alteración del apetito,...), que tras la administración de bajas dosis de agonistas de la dopamina incrementan estos síntomas en migrañosos, lo que lleva a la creencia de que los migrañosos son hipersensibles a la dopamina<sup>100</sup>. Esto ha dado pie al interés de esta vía en relación con la migraña y al estudio de los genes de sus receptores dopaminérgicos, de hecho, el gen *DRD2* se encuentra en 11q23 que está muy cerca del *locus* de ligamiento del cromosoma 11 identificado en la migraña (*MGR9*)<sup>101</sup>; aunque los estudios de asociación han proporcionado resultados contradictorios sobre su implicación en la MCA<sup>102,103</sup>. También se realizaron estudios con los transportadores de la dopamina, pero sin éxito<sup>104</sup>. Sólo en el caso del enzima dopamina β-hidroxilasa, que cataliza el paso de dopamina a noradrenalina, se han obtenido resultados positivos con algunos SNPs; aunque no han sido suficientemente replicados<sup>105,106,107</sup>.

## Introducción

Existen evidencias de que los neurotransmisores están implicados en la fisiopatología de la migraña. Durante las crisis, hay indicios de una estimulación excesiva que lleva a una sobreactivación de estructuras cerebrales como el tálamo. Debido a que GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro, y por estar presente en el 30-40% de las sinapsis<sup>108</sup>, muchos investigadores han buscado la relación de GABA con la migraña. A nivel periférico, los niveles de GABA son mayores en las plaquetas<sup>109</sup> y en la saliva<sup>110</sup> de migrañosos en comparación con controles sanos, así como también están elevados en el líquido cefalorraquídeo de pacientes depresivos durante los ataques de cefalea<sup>111</sup>. Además algunos fármacos que se emplean como profilácticos en el tratamiento de las cefaleas, como el topiramato y la gabapentina, son agonistas del receptor GABA<sub>A</sub><sup>112</sup>. Todos estos datos apoyan la posible relación de GABA con la migraña.

Algunos estudios de ligamiento han mostrado, que dos *loci* relacionados con genes de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, dan resultados alentadores: el *locus* Xq24-28 en familias de migrañosos australianas<sup>113</sup>, y el 15q11-13 con familias migrañosas italianas<sup>114</sup>. Este último trabajo no fue replicado en un estudio de asociación caso-control en una muestra finlandesa<sup>115</sup>.

Además de los genes de neurotransmisores y sus receptores, se han obtenido resultados positivos con el gen KCNK18 que codifica el TRESK, un canal de potasio de la familia K2P. Este gen se expresa en casi todas las neuronas aferentes de los ganglios trigeminal y de la raíz dorsal<sup>116</sup>, estando presente en las vías del dolor y la anestesia<sup>117</sup>. Mediante secuenciación Sanger se descubrió una mutación que cambia la pauta de lectura (F139Wfsx24) en una familia que segrega para migraña con aura. Los estudios funcionales de dicha mutación muestran que es la causante de una pérdida de funcionalidad del canal TRESK<sup>118</sup>, siendo esta la primera mutación descubierta para la migraña común.

Los estudios epidemiológicos demostraron que el número de migrañosos es mayor en el caso de las mujeres, si a esto añadimos el hecho de que muchas de ellas sufren una variación en la intensidad y número de crisis en periodos de alteración de los niveles hormonales, podemos pensar en la implicación de factores sexuales en este trastorno. Por esta razón se han llevado a cabo numerosos estudios al respecto. Los estudios de distintos polimorfismos en el receptor 1 de estrógenos (gen *ESR1*) han dado resultados contradictorios. Se han identificado hasta 3 SNPs distintos que parecen relacionados de alguna manera con la migraña, aunque no igual en todas las poblaciones analizadas. Colson et al<sup>119</sup> encontraron, en dos poblaciones Australianas, resultados significativos con el cambio de base G594A del exón 8

## Introducción

del gen *ESR1* lo que no se ha podido replicar en muestras españolas<sup>120</sup> ni finlandesas<sup>121</sup>; pero sí en americanos<sup>122</sup>. Lo mismo ocurrió con la mutación G325C del mismo gen, significativa en una población española<sup>120</sup> y corroborada por Schürks et al<sup>121</sup>, pero no asociada en otros estudios posteriores<sup>123</sup>. Mediante un estudio de interacción gen-gen, Oterino et al<sup>124</sup> asociaron, tanto para la MCA como para la MSA, varios genes de receptores de hormonas (*ESR1*, *ESR2* y *FSHR*), sugiriendo interacción gen-gen entre estos tres genes. La relación entre las hormonas sexuales y la migraña es tal que la interacción entre la mutación 594A del gen *ESR1* y la inserción de un elemento Alu en el intrón 7 en el gen de la progesterona (alelo PROGINS) aumenta 3,2 veces el riesgo de padecer migraña<sup>125</sup>. Otra mutación del gen del receptor de la progesterona (Val660Leu) muestra significación ( $p=0,0007$ ) con la migraña asociada al vértigo en mujeres, siendo dos veces más probable la migraña asociada al vértigo en los individuos que presentaban el alelo T, alelo que determinaba el aminoácido leucina. Sin embargo, no hay resultados significativos si se estudia este polimorfismo en la migraña con y sin aura por separado<sup>126</sup>.

Una de las teorías del posible origen de la migraña es la teoría vascular, según la cual, variaciones en el diámetro de los vasos sanguíneos serían el desencadenante de las crisis de migraña. Siguiendo esta teoría, varios grupos de investigación analizaron genes de diferentes factores vasculares implicados en el endotelio como por ejemplo el gen del enzima convertidor de la angiotensina 1 (*ACE*)<sup>127</sup>, la óxido nítrico sintasa (*NOS*)<sup>128</sup>, el receptor de endotelina tipo A (*ENDRA*), y la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*). Otro gen de origen vascular, estudiado en la migraña, es el *NOTCH3*, debido a que mutaciones en este gen causan el CADASIL, una arteriopatía que incluye entre sus síntomas episodios de MCA. El estudio del *ENDRA* permitió encontrar una mutación (A-231G), más frecuente en individuos con antecedentes familiares de migraña grave, aunque no pudo replicarse en una muestra de individuos menores edad<sup>129</sup>. Estudios en una muestra portuguesa, mostraron una relación entre otra mutación de este gen en relación con la MSA<sup>130</sup>.

También se obtuvieron resultados positivos en el caso de la *MTHFR*, gen que codifica un enzima de la ruta de los folatos, pero en este caso, sobre todo en migrañosos con aura. Los estudios sobre el gen *MTHFR* mostraron la existencia de una mutación, la C677T, que estaba asociada con la migraña. Más concretamente, el genotipo TT parecía conferir un riesgo de padecer MCA. Esta asociación se sugirió en estudios realizados en muestras poblacionales japonesa<sup>131</sup>, turca<sup>132</sup>, australiana<sup>133</sup> y americana<sup>134</sup>. Sin embargo, Schürks et al<sup>135</sup> concluía algo totalmente contrario a lo obtenido anteriormente, ya que en su población el genotipo TT era un factor protector frente a la MCA. A pesar de que el tamaño muestral de este estudio es lo

## Introducción

suficientemente grande como para sacar conclusiones fiables, el hecho de que el diagnóstico de las participantes en el estudio fuera sólo a través de una encuesta en papel y no con una posterior entrevista en la que un médico las asignara una categoría según criterios IHS, o que la muestra seleccionada se redujera a mujeres mayores de 45 años, lo que no representa a todo el espectro poblacional, podrían ser algunas de las razones de que la conclusión de este estudio no sólo no corrobore otros realizados, sino que sea completamente distinto y no pueda ser extrapolable a la población general.

Hay también otro estudio realizado en una población española en el que, si bien este alelo T es más frecuente en los migrañosos con aura, no determina un mayor riesgo de padecerla, pero tampoco es un factor protector<sup>136</sup>. La mutación C677T de este gen, provoca un cambio aminoacídico en el dominio catalítico, lo que disminuye la funcionalidad media del enzima en un 30%<sup>137</sup>, dando esto lugar a su vez, a un aumento de los niveles de homocisteína que están asociados al daño en células endoteliales.

### Loci de la migraña:

Los mapeos genómicos han permitido obtener información de ciertas regiones del genoma humano o *loci*, donde aparecían diferencias entre individuos migrañosos y sanos pertenecientes a una misma familia. En estos *loci*, se localizan unos genes, denominados “genes candidatos posicionales”, por cuanto se encuentran en el segmento cromosómico ligado a la enfermedad, y que podrían estar relacionados con alguno de los mecanismos que determina la aparición de migrañas. En total hay trece *loci* para la migraña común y cuatro para la migraña hemipléjica familiar.

**MGR1 (MIM: %157300):** este *locus*, que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4 (4q24), fue descubierto por Wessman et al<sup>138</sup> en una muestra de 50 familias Finlandesas con MCA, obteniendo que el marcador D4S1647 que se encuentra en esta área es un *locus* de susceptibilidad para la migraña con aura. El intento de replicación de este estudio en una población Islandesa dio como resultado el descubrimiento de otro *locus* de riesgo (4q21 D4S1534) que se solapa con el anterior, aunque en este caso las familias tenían MSA, predominando más en mujeres que en hombres<sup>139</sup>. Todos estos datos parecen indicar que en esta zona se encuentran genes de susceptibilidad tanto para MCA como MSA.

En 2006 Anttila et al<sup>140</sup> desarrollaron un estudio sobre el locus 4q24 analizando los síntomas predominantes de la migraña con dicho *locus*. Encontraron asociación significativa entre el marcador D4S1647 y síntomas que acompañan a las crisis como la fotofobia y

sonofobia. También sugieren un ligamiento con otras características de los ataques como la intensidad del dolor, la unilateralidad y la pulsatilidad.

**MGR 2 (MIM: %300125):** debido a la predominancia de la migraña en las mujeres y al hecho de que en algunas familias de migrañosos sólo las mujeres padecían migraña, mientras que los hombres afectados tienen más probabilidad de transmitirla era esperable que los estudios encontrarán un *locus* para la migraña en el cromosoma X<sup>113</sup>. Pero no fue hasta 2000 cuando se delimitó la región Xq24-28 que presentaba ligamiento en dos de las tres familias con migraña analizadas en el estudio<sup>141</sup>. En este *locus* se encuentra una agrupación de genes que codifican subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, los genes *GABRQ*, *GABRA3*, *GABRE*, a pesar del importante papel que juega en la fisiopatología de la migraña, no se encontró asociación con ninguno de estos genes<sup>112</sup>.

Además de los genes GABA, en el cromosoma X también se encuentran otros genes candidatos como el *GJB1* (conexina 32), *AR* (receptor andrógenos), *IL2RG* (receptor gamma de la interleucina 2), *CXCR3* (receptor de quimiocinas), *NLGN3* (neuroligina 3), *DYT3* (distonía 3 con Parkinson), *GPR23* (receptor del ácido lisofosfatidilo), que se localizan en el cercano *locus* Xq12-q21, pero ninguno de ellos ha dado resultados significativos.

**MGR 3 (MIM: %607498):** Un grupo sueco sugirió que el *locus* 6p21.1-p12.2 podía tener relación con la migraña con y sin aura<sup>142</sup>. En este *locus* se encuentran genes candidatos como el transportador de solutos *SCL25A27*, un canal de cloro intracelular (*CLIC5*)<sup>143</sup> y el gen *PLA2G7* de la fosfolipasa A<sub>2</sub> del grupo VII. Recientemente, este *locus* ha sido corroborado en un estudio de asociación familiar con familias españolas<sup>144</sup>.

Un estudio realizado en 2005 en el que se tomaban por separados los distintos síntomas que sirven para diagnosticar la migraña obtuvo resultados positivos para el cromosoma 6 en más de la mitad de los síntomas estudiados, destacando los resultados obtenidos en el caso de la fotofobia y la incapacidad que se asocian a la migraña<sup>145</sup>.

**MGR 4 (MIM: %607501):** Este *locus* para la migraña está situado en el cromosoma 14 (14q21.2-q22.3) y se identificó por primera vez en una familia italiana con MSA<sup>146</sup>.

En este segmento cromosómico podemos destacar los genes *GCH1* (GTP-hidroxilasa 1), enzima que participa en la ruta de síntesis de un cofactor empleado por numerosas enzimas, y *SPG3A* (atlastina), péptido homólogo de GTPasas involucradas en la neurotransmisión, y responsable de la paraplejía espástica hereditaria tipo 3, por lo que ambos son considerados genes candidatos a estudio.

## Introducción

**MGR 5 (MIM: %607508):** A pesar de que estudios previos mostraron la existencia para la FHM de un gen implicado en el *locus* 19q13<sup>147</sup>, en 2001 Jones et al<sup>148</sup> descubrieron otro locus entre los marcadores D19S427 y D19S592 en 16 familias con MCA, pero sin relación con el gen *CACNA1A*. Es en esta región donde McCarthy et al<sup>149</sup> encontraron asociación significativa entre 5 SNPs del gen *INSR*, un receptor de insulina. Sin embargo, su replicación en otra muestra de casos y controles no dio ninguna asociación significativa pudiendo deberse al pequeño tamaño de la muestra. La secuenciación de este gen por parte de Curtain et al<sup>150</sup> en 6 individuos migrañosos de una misma familia no mostró ninguna mutación asociada a la migraña.

En esta región se localizan otros genes candidatos como el *TNFSF7*, un anticuerpo de superficie que sólo se encuentra en los linfocitos B y T activados. El estudio llevado a cabo por Smith et al<sup>151</sup> en una muestra de casos controles, aparece una posible implicación de este gen con la MSA, pero todavía es necesario realizar más estudios sobre este gen y otros homólogos localizados en la misma región, como son el *TNFSF9* y el *TNFSF14* para tener datos concluyentes.

**MGR 6 (MIM: %607516):** En 1997 Gardner et al<sup>152</sup> encontraron que este *locus* 1q31, se asociaba a familias de MHF autonómica dominante hasta con un 80% de penetrancia. Estas familias no mostraban ningún tipo de asociación con los genes antes descritos para la MHF. No obstante, en esta región 1q31, se encuentra otro canal de calcio, *CACNA1E*<sup>143</sup>, cuya secuencia es altamente similar a *CACNA1A* (FHM1), lo que lo postuló como un posible candidato para MHF, en lo que podría ser el *locus* FHM4. Ya en 2002, el grupo de Lea, encontró también una asociación significativa entre los marcadores D1S249 y D1S2782, tanto para la MHF como para la migraña común, siendo más significativos los resultados obtenidos para la MCA (LOD score 3,36;  $p=0,00004$ )<sup>153</sup>.

Los análisis posteriores de los distintos genes de esta región no consiguieron resultados significativos<sup>154</sup>, aunque se ha sugerido cierta relación entre el cromosoma 1 y síntomas de la migraña como las náuseas y los vómitos, siendo muy significativa su relación con la fotofobia<sup>145</sup>.

**MGR 7 (MIM: %609179):** debido al papel del GABA en la fisiopatología de la migraña y a la función inhibitoria de este neurotransmisor, Russo et al<sup>155</sup> realizaron un estudio sobre 10 familias que presentaban criterios de MCA en la región 15q11-q13 donde se localizan los genes de tres subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> (*GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*). El análisis de las familias mostró cierto ligamiento con este *locus*. De hecho, la secuenciación de los genes del

## Introducción

receptor GABA<sub>A</sub> situados en 15q11-q13, mostró una posible mutación en el gen *GABRB3* presente en todos los migrañosos de una de las familias estudiadas.

En la misma línea de asociaciones positivas se encuentra un estudio de esta región realizado por Netzer et al<sup>114</sup> en familias italianas con MCA. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser corroborados en una población finlandesa<sup>115</sup>, reduciendo la posibilidad de que estos genes contribuyan a la susceptibilidad a la migraña con aura.

Aparte de los comentados genes GABA existen otros genes localizados en este *locus*, como son *OCA2* (Albinismo oculocutáneo 2), *HERC2* (Dominio hect), *APB2* (Subunidad β del complejo adaptador de la clatrina AP2), *NDNL2* (gen parecido a la necdina 2), *SNRPN* (Polipéptido N de la ribonucleoproteína nuclear pequeña), *UBE3A* (Ubiquitin-proteín quinasa 3A) y *ATP10A* (ATPasa V tipo 10A). El gen de la ATPasa también se postuló como posible candidato a estar implicado en la migraña, pero la secuenciación del mismo no dio resultados positivos<sup>155</sup>.

Los estudios de replicación llevados a cabo posteriormente no consiguieron asociar este *locus* y la MCA. Netzer et al<sup>114</sup>, mediante genotipado de SNPs, obtuvieron 4 SNPs que estarían asociados con esta región, pero este resultado no fue consistente ya que el aumento del tamaño muestral no dio asociaciones positivas. Posteriormente, Oswell et al<sup>115</sup>, en una muestra finlandesa, volvió a mostrar la falta de asociación entre los genes del receptor GABA situados en el cromosoma 15 y la migraña con aura.

**MGR 8 (MIM: %609570):** Nyholt et al<sup>145</sup> estudiaron una población de gemelos tomando en cuenta tanto los síntomas de la migraña por separado como en conjunto, y obtuvieron resultados significativos en el *locus* 5q21. Este estudio concluyó que es posible que en este cromosoma se encuentre un gen de la migraña general, ya que diez de los síntomas empleados para el diagnóstico de la migraña dieron un resultado altamente significativo. Se replicó el estudio en una segunda cohorte de individuos de mayor edad a la que se realizó menos preguntas; sin embargo, los resultados obtenidos siguen siendo significativos para la MSA.

**MGR 9 (MIM: %609670):** Un estudio realizado en familias con MCA canadienses dio resultados positivos en el *locus* 11q24<sup>101</sup>.

En este *locus* cabe destacar la presencia de genes de canales de potasio (*KCNJ1* y *KCNJ5*) expresados en la corteza cerebral<sup>156</sup>, debido a que el potasio es un ión implicado en la

## Introducción

transducción de señales y los impulsos nerviosos, son genes candidatos de participar en la fisiopatología de la migraña.

Otros genes que se encuentran en este *locus* son: el *SCNB2*, que codifica para un canal de sodio que se localiza de manera ubicua en el cerebro,<sup>157</sup> y el gen *GRIK4* que es el receptor kainato de glutamato, con una extensa distribución por el sistema nervioso central<sup>158</sup>. En estos genes, su relación con la fisiopatología de la migraña reside en el hecho de que existe un exceso de excitación y el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio, siendo su liberación inhibida a través de los canales de sodio sensibles a voltaje<sup>159</sup>.

**MGR 10 (MIM: %610208):** en 2006 Anttila et al<sup>140</sup> encontraron asociación entre la pulsatilidad y el cromosoma 17p13, tanto bajo homogeneidad como bajo heterogeneidad de *locus*. También se vieron resultados cercanos a una asociación significativa entre los vómitos y el marcador D17S945 que se encuentra en este locus.

**MGR 11 (MIM: %610209):** El estudio llevado a cabo por Anttila et al<sup>140</sup> en el que se analizaron los síntomas acompañantes de la migraña y distintos marcadores cromosómicos, dio también resultados positivos en el cromosoma 18q12. En este caso, se encontró asociación de este *locus* con la migraña cuando se analizan los pacientes con todos los criterios IHS de migraña, como para los síntomas tomados por separado. Así, el marcador D18S1107 se encuentra asociado de manera nominal a la duración de la crisis, y el marcador D18S56, parece sugerir un ligamiento con el agravamiento a consecuencia del ejercicio físico. Sin embargo, no se asocia a ningún marcador concreto.

**MGR 12 (MIM: %611706):** Anttila et al<sup>160</sup> hicieron un análisis de ligamiento en 210 familias y 1675 sujetos de dos poblaciones, una Finlandesa y otra Australiana. Los resultados en la población finlandesa mostraron un *locus* de migraña en el cromosoma 10 (10q22-q23), que fue replicado en la muestra australiana. Al analizar los resultados por sexos, se comprobó que existía mayor ligamiento en las mujeres hasta resultar altamente significativo (LOD 7,68 en 103cM), mientras que en los hombres bajan los niveles, perdiendo la significación.

Varios grupos estudiaron el *locus* 10q22-q23, entre los marcadores D10S1786 y D10S1686, tratando de encontrar un haplotipo asociado con la migraña, si bien ninguno de los trabajos obtuvo resultados positivos. En este *locus* se encuentran dos genes candidatos para la migraña: el gen *KCNMA1*, que codifica un canal de potasio que detecta los niveles de calcio, denominado Maxi-K, e implicado en el transporte iónico y el gen de la neuregulina 3 (*NRG3*), perteneciente a la familia de factores de crecimiento y diferenciación celular.

## Introducción

Este *locus* se relaciona no sólo con la migraña en general, sino también con algunos de sus síntomas estudiados por separado, destacando su relación con la fotofobia y la fonofobia<sup>145</sup>.

**MGR 13 (MIM: %613656):** en 2010 Lafrenière et al<sup>118</sup> estudiaron una familia con migraña con aura y encontraron una mutación en el gen *KCNK18*, que codifica TRESK, un canal de potasio implicado en las vías del dolor y en la excitabilidad neuronal, lo que lo convierte en un firme candidato a estar relacionado con la fisiopatología de la migraña.

La secuenciación de este gen del cromosoma 10 (10q25.3), permitió detectar una mutación deletérea, muy poco frecuente (no se detectó en ninguno de los 80 controles sanos secuenciados). Este hallazgo es un ejemplo de cómo mutaciones raras pueden ser la causa de trastornos comunes.

**ETL 4 (MIM: %611631):** en 2007 Deprez et al<sup>161</sup> estudiaron 5 generaciones de una familia belga con epilepsia del lóbulo occipitotemporal, en la que alguno de sus miembros presentaban migraña con aura. De esta investigación se obtuvo que el *locus* 9q21-q22 que estaba ligado a esta patología. Un año más tarde Teive et al<sup>162</sup> hipotetizaron con que la posible relación entre la epilepsia estudiada por Deprez y la migraña con aura podría basarse en la depresión cortical diseminada propuesta por Leão<sup>18</sup>.

El estudio de ligamiento llevado a cabo en 36 familias Finlandesas en las que al menos dos individuos presentaban aura visual de tipo escotoma brillante, con el fin de encontrar un *locus* de susceptibilidad para el aura visual, dio resultado positivo para la región 9q21-q31<sup>163</sup> que se solapa con el locus encontrado por Deprez, lo que parece indicar que este *locus* contribuiría a la excitabilidad neuronal general.

El gen *SCH3* que regula la adaptación neuronal contra el estrés ambiental está situado en esta región y se expresa en los lóbulos temporal y occipital lo que lo hace un buen candidato a estudio, pero aún es necesario realizar más análisis sobre esta zona para poder tener resultados concluyentes.

### Loci de la migraña hemipléjica familiar:

La migraña hemipléjica familiar es un raro trastorno que se caracteriza por hemiplejía en al menos dos miembros de la familia, con o sin ataxia, confusión o coma. Esta variante de la migraña se presenta con herencia autosómica dominante y elevada penetrancia. Aunque no se

## Introducción

conocen todos los genes implicados en la migraña hemipléjica familiar, se han descubierto 3 genes que explican dos tercios de los casos que presentan este fenotipo.

**FHM 1 (MIM: %141500):** El rastreo cromosómico de familias con migraña hemipléjica dio como resultado un *locus* de ligamiento en el cromosoma 19, entre los marcadores D19S216 y D19S215<sup>164</sup>. Posteriores estudios afinaron más la localización, hasta encontrar que mutaciones en el gen *CACNA1A* eran responsables de la aparición de FHM en algunas familias<sup>147</sup>.

*CACNA1A* es el primer gen implicado en migraña, codifica la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio tipo P/Q dependiente de voltaje, cuyos transcritos se localizan en cerebelo, corteza cerebral, tálamo e hipotálamo. Las mutaciones de este gen tienen distinto significado funcional dependiendo del tipo celular donde se expresen, pero, comúnmente, se produce un aumento del flujo de entrada de iones calcio y un descenso de la densidad de corriente máxima en las neuronas. Además, suelen cambiar los voltajes de activación a potenciales más negativos de manera que se incrementa la actividad del canal a despolarizaciones más débiles. Estos efectos, aunque contradictorios, podrían explicar tanto la migraña como el aura, ya que estas dos fases no se producen al mismo tiempo.

Otros trastornos neurológicos en los que están implicadas variaciones de este gen son la ataxia episódica tipo 2 (EA2)<sup>147</sup> y la ataxia espinocerebelosa (SCA6)<sup>165</sup>.

**FHM 2 (MIM: %602481):** Echenne et al<sup>166</sup> estudiaron una familia con migraña hemipléjica que presentaba ligamiento al cromosoma 1. Posteriormente se estudió en tres pedigrees franceses confirmando la relación del locus 1q21-q23 con la MHF<sup>167</sup>.

Tras diversos estudios se han conseguido identificar hasta 14 mutaciones en el gen *ATP1A2*,<sup>168,169,170</sup> localizado en este *locus* y que es el segundo gen relacionado con la MHF. Este gen codifica la isoforma  $\alpha_2$  de una sodio-potasio ATPasa. Las mutaciones en este gen determinan una ausencia de función de la ATPasa, por tanto la migraña sería consecuencia de una haploinsuficiencia que provocaría la hiperpolarización celular por el aumento del potasio extracelular.

Este gen también está implicado en otros trastornos relacionados con la migraña hemipléjica familiar como son la hemiplejía alternante de la infancia<sup>171,172</sup>, y la migraña familiar basilar<sup>173</sup>.

**FHM 3 (MIM: %609634):** En 2005 Dishgans et al estudiaron 20 familias Europeas para los *locus* MHF conocidos hasta el momento, encontrándose con que 11 familias no presentaban ninguna mutación en aquellos genes. Estudios más exhaustivos sobre estas familias permitió encontrar ligamiento en otra región del genoma, el cromosoma 2 y más concretamente 2q24.3, tras lo cual comprobaron que en tres familias había un haplotipo común, a pesar de no existir relación entre ellas. El análisis posterior de los genes de este *locus* mostró una mutación en el gen *SCN1A*<sup>174</sup>. De este modo se reconoció el tercer gen relacionado con la MHF y denominado FHM3<sup>175</sup>.

El gen *SCN1A* codifica la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio neuronal tipo 1, se expresa principalmente en neuronas centrales, periféricas y cardiomiocitos. Experimentos hechos en ratones, muestran que las mutaciones en este gen provocan un descenso en la corriente de sodio, lo que, en las interneuronas gabaérgicas, puede condicionar un estado de hiperexcitabilidad<sup>176</sup>.

Este gen está implicado en numerosas patologías como epilepsia<sup>177</sup>, convulsiones febriles familiares 3A<sup>178</sup>, epilepsia generalizada con convulsiones febriles<sup>179</sup> y el síndrome Dravet<sup>180</sup> entre otros.

### **Otros genes implicados en la migraña hemipléjica familiar:**

Además de los *loci* ya estudiados recientemente se ha descrito otra mutación en un cotransportador de sodio y bicarbonato NBCe1 que parece estar relacionado con la migraña hemipléjica familiar. Mutaciones del gen *SLC4A4* que codifica este cotransportador, están implicadas en la acidosis del túbulo renal proximal y anomalías oculares, pero un estudio llevado a cabo Japón con dos hermanas que además de esos antecedentes previos también presentaban migraña hemipléjica (sin mutaciones en los *loci* ya estudiados), demostró la existencia de una mutación C-terminal en el gen *SLC4A4* desconocida hasta el momento y que podría ser la causante de la migraña<sup>181</sup>. La posible implicación de este gen en la fisiopatología de la migraña es que la mutación encontrada causa un fallo con pérdida casi total de la funcionalidad de NBCe1 en los astrocitos, reduciéndose así la alcalización intracelular de las células C6 del glioma. Este descenso en las capacidades de tampón de la alcalosis extracelular provoca un desequilibrio en el pH sináptico pudiendo incrementar la excitabilidad neuronal<sup>182</sup>.

### El presente y futuro de la genética: Los GWAS.

En la actualidad los estudios genéticos han evolucionado hasta la aparición de los GWAS (del acrónimo inglés Genome-Wide Association Study), que son estudios de asociación

## Introducción

del genoma realizados a gran escala y que permiten estudiar millones de marcadores génicos de grandes tamaños muestrales. En el primer GWAS de migraña realizado, participaron investigadores de 40 centros de toda Europa para un total de 50.000 individuos analizados<sup>183</sup>. El estudio se planteó en dos fases: en una primera fase compararon los genomas de 2.748 pacientes de migraña con 10.747 controles. La segunda fase, que sirvió de réplica de los resultados, estaba formada por una muestra de 3.202 pacientes y 40.062 controles. En ambas muestras se encontró que había una variante en el cromosoma 8 (rs1835740) que hacía a los que la presentaban más propensos a padecer migrañas.

Esta variante se localiza entre los genes *PGCP* (glutamato carboxipeptidasa plasma) y *MTDH* (también llamado *AEG-1* o metadherina). El primero de ellos es responsable de la hidrólisis de péptidos circulantes y el segundo es el gen que regula al principal transportador de glutamato en el cerebro.

Un meta-análisis de GWAS en seis cohortes europeas fue realizado por Ligthart et al<sup>184</sup> en el segundo GWAS llevado a cabo en migraña. Sólo el rs9908234 del gen *NGFR* (receptor del factor de crecimiento nervioso) obtuvo resultado significativo si bien no pudo replicarse en otras cohortes de Países Bajos y Australia.

En 2011 un tercer GWAS llevado a cabo por Chasman et al<sup>185</sup>, ningún SNP estudiado alcanzó el nivel de significación de los estudios GWAS ( $p < 10^{-8}$ ) en la fase de descubrimiento (cohorte formada exclusivamente por mujeres, 5.122 migrañosas y 18.108 controles sanas). Sin embargo, el meta-análisis realizado posteriormente con las cohortes de réplica, empleando los loci más cercanos a la significación, dio resultados positivos para tres SNPs (rs2651899, rs10166942 y rs111721113), aunque no mostraron diferencias al comparar migrañosos con aura frente a migrañosos sin aura. Estos tres SNPs se encuentran en regiones con genes conocidos (*LRP1*, *PRDM16* y *TRPM8*). El primero de estos genes *LRP1*, receptor de lipoproteínas, está implicado en la señalización glutamatérgica, presente en las neuronas y asociado a los receptores NMDA, que se coexpresan en las mismas neuronas. La relación entre el gen *PRDM16* y la migraña no es muy clara ya que es un factor de transcripción, mientras que la relación más llamativa es la del gen *TRPM8*, que codifica un canal catiónico presente en neuronas sensoriales sensibles al frío y asociadas a la sensación dolorosa quemante que provoca el frío. Se expresa en las neuronas sensitivas del ganglio raquídeo y en neuronas del asta posterior. No se replicó el resultado del GWAS de Anttilla et al<sup>183</sup> del cromosoma 8. No obstante, hay que destacar que entre los SNPs con significación  $10^{-5} > p > 10^{-8}$ , también se encontraba el SNP correspondiente al gen *TRPM8*.

## Introducción

Este último resultado nos indica posibles *loci* de susceptibilidad, pero es necesario llevar a cabo más estudios, en los que no sólo sea importante el número de individuos que componen la muestra, sino también la calidad de la misma, es decir, una buena categorización de los individuos que es crucial para asegurar homogeneidad de diagnóstico. Sorprende, no obstante, la ausencia de genes de susceptibilidad de migraña y el escaso tamaño del efecto que confieren los marcadores asociados ( $OR < 2$ ). De igual forma, quedan en entredicho todos los esfuerzos de asociación genética previos a estos trabajos. Concretamente, el GWAS de Chasman descartó rotundamente que *ESR1* como factor genético de migraña.

El primer GWAS en migraña sin aura replicó los resultados para los *loci TRPM8* y *LRP1* descubiertos por Chasman et al, además de encontrar otros 4 *loci* (*MEF2D*, *TGFBR2*, *PHACTR1* y *ASTN2*) desconocidos hasta ahora<sup>186</sup>. La réplica de estos *loci* en otras poblaciones, sólo dio resultados consistentes en el gen *MEF2D* que codifica el factor potenciador del miocito 2D y el gen *TGFBR2* que codifica para el receptor del factor de crecimiento transformante beta 2, mientras que en *PHACTR1* (regulador de actina y fosfatasa 1) y *ASTN2* (astrotactina 2) la réplica dio resultados muy débiles.

### Otros síndromes:

La migraña forma parte de las cefaleas primarias, de modo que además de hablar de los estudios genéticos llevados a cabo en la migraña hemipléjica familiar, la migraña no hemipléjica y en sus formas clínicas más frecuentes (migraña con y sin aura) es preciso hablar de las cefaleas en racimo, así como de otros síndromes que se presentan acompañados por crisis de migraña.

#### - Cefalea en racimos:

A pesar de que el riesgo relativo de familiares de primer grado de pacientes de cefalea en racimo es de 39 veces mayor que el existente en la población general<sup>187</sup>, no se han encontrado evidencias de herencia genética, lo que parece indicar que el factor genético sería infrecuente o bien de baja penetrancia en la población.

Los estudios genéticos llevados a cabo para la cefalea en racimo no han dado resultados positivos ni en el caso del gen *CACNA1A* de la migraña hemipléjica familiar (*FHM1*)<sup>188,189</sup>, ni con genes de los enzimas catalizadores de la síntesis del ácido nítrico (*NOS1*, *NOS2*, *NOS3*)<sup>190</sup>. Sin embargo, en el caso del gen cuyo producto es el receptor 2 de la hipocretina (*HCRTR2*) y relacionado con la regulación del ciclo sueño-vigilia, a pesar de secuenciarlo completamente y no obtener ninguna mutación, la realización de un rastreo

## Introducción

genómico dio como resultado la presencia de 4 *loci* potenciales, si bien en ningún cromosoma llegaron a alcanzar el mínimo nivel de significación<sup>191</sup>. En este gen sólo el polimorfismo G1246A ha mostrado asociación con la cefalea en racimos en diversas poblaciones europeas<sup>192</sup>.

En la misma línea de estudio que el receptor de la hipocretina, está en estudio del gen *CLOCK*, o más concretamente de su polimorfismo T3111C, relacionado con los ritmos circadianos en humanos. A pesar de que no se encontró asociación alguna entre este polimorfismo y la cefalea en racimos en ninguna de las dos muestras estudiadas<sup>193,194</sup>, no puede excluirse la existencia de otro gen relacionado con los ritmos biológicos que esté asociado a la cefalea en racimos.

### - CADASIL:

El CADASIL (acrónimo inglés de Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) es una enfermedad en cuyo cuadro sintomático se encuentra la migraña con aura, esto, unido al hecho de que en algunos pacientes se puede presentar parálisis en alguna parte del cuerpo y que es una enfermedad hereditaria, hizo pensar que tenía alguna relación con la migraña hemipléjica familiar.

Los estudios genéticos descartaron esta posibilidad. Sin embargo, encontraron que existía una asociación alélica entre una región en el brazo corto del cromosoma 19<sup>195</sup> muy cercana al locus de la migraña hemipléjica familiar (FHM1), pero en este caso el gen asociado con el CADASIL es *NOTCH3*<sup>196</sup>, más concretamente el cambio aminoacídico Arg153Cys. Esta mutación se ha demostrado en 8 miembros afectados en una familia italiana con MCA prolongada,<sup>197</sup> que consiste en fenómenos visuales, sensitivos, motores y afasia, que además mostraron, en la resonancia magnética, lesiones en la sustancia blanca, sin infartos cerebrales. Estos hechos sitúan al gen *NOTCH3* como factor de migraña en determinados casos, sobre todo si hay evidencia de lesiones subcorticales en la sustancia blanca observables en una resonancia magnética.

### - Mitocondriopatías:

Algunas mitocondriopatías se han relacionado con la migraña en casos individuales o en cierta asociación familiar. El síndrome más representativo es el MELAS (acrónimo inglés de Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes), y la mutación que lo causa con más frecuencia, la A3243G, ha sido analizada y descartada junto a otras posteriormente en muestras de migrañosos con y sin aura<sup>198,199</sup>. El cambio de nucleótido A11084G de la subunidad ND4 del complejo I de la cadena respiratoria, está sobreexpresado (26%) en los migrañosos japoneses<sup>200</sup>, pero no en la población nórdica, donde no fue

identificado en ningún caso<sup>201</sup>. Sí puede existir relación con un mayor riesgo de infarto migrañoso y mutaciones mitocondriales menores<sup>202</sup>.

- Síndrome HERNS:

La migraña también se ha descrito en asociación con otra endotelopatía, el síndrome HERNS (acrónimo inglés de Hereditary Endotheliopathy with Retinopathy, Nephropathy and Stroke) que cursa con retinopatía, nefropatía e ictus. Se descartó una asociación con el locus del CADASIL<sup>203,204</sup>. Posteriormente, tras rastreo genómico completo en esta extensa familia alemana, se encontró ligamiento al cromosoma 3p21.1-p21.3, con una puntuación LOD máxima de 5,25, con el marcador D3S1578. El análisis de otras dos familias con un fenotipo similar demostró también ligamiento a este mismo *locus*, que junto a la anterior dan una puntuación LOD de 6,30 y definen la región candidata de 3cM entre los marcadores D3S1578 y D3S3564 para esta endotelopatía<sup>205</sup>. Estudios posteriores de los genes de esta región han encontrado mutaciones del gen *TREX1* en 9 familias con HERNS<sup>206</sup>. *TREX1* una 3'-5' exonucleasa relacionada con otras enfermedades, pero que en el caso del HERNS las mutaciones de este gen no modifican el dominio transmembrana del enzima sino que varían su localización intracelular. La hipótesis en este caso es que las variaciones en la ubicación no le permiten realizar bien su papel debido a la insuficiente cantidad de *TREX1* en la localización correcta<sup>207</sup>.

## 1.7.- RECEPTORES GABA

Existen distintas clasificaciones de los receptores GABA. En cuanto a su funcionalidad los receptores GABA se dividen en: ionotrópicos y metabotrópicos. Sin embargo, si atendemos a su farmacología podríamos dividirlos en tres grupos distintos: GABA<sub>A</sub> (sensibles a bicuculina), GABA<sub>B</sub> (sensibles a baclofén) y GABA<sub>C</sub> (insensibles tanto a bicuculina como a baclofen). Lo más extendido en la actualidad es la consideración de los receptores GABA<sub>C</sub> como una variedad dentro de los receptores GABA<sub>A</sub>.

### Receptores GABA<sub>A</sub>:

Los receptores GABA<sub>A</sub> son receptores ionotrópicos o también llamados canales iónicos dependientes de ligando, y son los responsables de las respuestas inhibitorias rápidas. Estos receptores se localizan en las neuronas postsinápticas. Al unirse el neurotransmisor (en este caso GABA) al receptor, el canal de cloruro al que se asocian deja entrar el ión hacia el interior celular, desencadenando una hiperpolarización de la membrana de la neurona, que lleva al bloqueo de la transmisión sináptica.

El receptor GABA<sub>A</sub> es una glicoproteína pentamérica transmembranal de 275kDa que forma el ionóforo, y que posee sitios de unión para distintas moléculas reguladoras de su actividad. Se han identificado numerosas subunidades de este receptor, cada una de las cuales a su vez presenta variantes  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta_1$ ,  $\epsilon_1$ ,  $\eta_{1-2}$ ,  $\pi_1$ ,  $\theta_1$  y  $\rho_{1-3}$ , aunque con un 70% de identidad entre las distintas isoformas. La combinación al azar de estas isoformas daría lugar a más de 2.000 variantes del receptor GABA<sub>A</sub>. Sin embargo, en realidad la mayoría de los receptores presentan 2 subunidades tipo  $\alpha$ , 2 tipo  $\beta$  y una tipo  $\gamma$ , restringiendo a poco más de 20 las variantes de receptores GABA<sub>A</sub> existentes. Las subunidades  $\rho$  suelen presentarse como homómeros, lo que les confiere unas propiedades farmacológicas especiales y es por ello que algunos autores las consideran formadoras de un tipo distinto de receptores GABA, los GABA<sub>C</sub>.

Estructuralmente un receptor tipo GABA<sub>A</sub> está constituido por 5 subunidades proteicas alrededor de un poro central que es el canal iónico propiamente dicho, esta estructura presenta distintos sitios de unión para diversas moléculas:

- Sitio para el canal iónico (el receptor GABA<sub>A</sub> forma canales de cloro).
- Sitio alostérico adicional de unión a fármacos como benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides, zinc, etanol.
- Sitio del agonista endógeno GABA.

## Introducción

- Sitio de reconocimiento de baja afinidad preferentemente antagonizado por las benzodiazepinas.
- Sitio de reconocimiento de alta afinidad (es una forma desestabilizada del receptor).
- Sitio del agonista exógeno.
- Sitio de los agonistas inversos:  $\beta$ -carbolinas.
- Sitio de los agonistas parciales: ciclopirrolonas.
- Sitio del co-agonista.
- Sitio de los antagonistas selectivos: bicuculina.
- Sitio de los antagonistas no selectivos: flumazenil.

Dentro de los receptores GABA<sub>A</sub> la combinación que se encuentra más frecuentemente en el cerebro de mamíferos es la formada por las subunidades  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ . Sin embargo, en la retina, los receptores ionotrópicos presentes son homómeros constituidos por la subunidad  $\rho$ , en los denominados receptores GABA<sub>C</sub>. Normalmente, este tipo de receptores están formados por combinaciones de las distintas subunidades  $\rho$ , bien sea formando receptores hetero- u homo-oligoméricos, pero en algunos casos se han observado receptores con propiedades intermedias entre receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>, debido a que se forman con las subunidades  $\rho$  de los receptores GABA<sub>C</sub> y la subunidad  $\gamma_2$  de los GABA<sub>A</sub>.

Los receptores GABA<sub>A</sub> se encuentran en todas las regiones cerebrales, pero no todas las subunidades se localizan de modo tan ubicuo. Las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  y  $\gamma_2$  se encuentran en todas las regiones cerebrales menos en las células granulares del bulbo olfativo, el núcleo reticular del tálamo y motoneuronas de la médula espinal<sup>208,209</sup>; zonas, sin embargo, donde se localizan las subunidades  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ . Además, la subunidad  $\alpha_3$  es el subtipo principal en las células colinérgicas del prosencéfalo basal y monoaminérgico<sup>210</sup>, y el núcleo reticular talámico<sup>211</sup>. La subunidad  $\alpha_2$  también está en el núcleo central de la amígdala y el segmento inicial axónico de las células del córtex cerebral. Estas dos subunidades se suelen coexpresar con las subunidades  $\beta_3$  y  $\gamma_2$ . La subunidad  $\alpha_4$  se localiza en el tálamo y giro dentado<sup>212</sup>, mientras que  $\alpha_5$ , aunque es poco abundante, se encuentra principalmente en el hipocampo, y en la base de las espinas de las dendritas de células piramidales. Otra de las subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha_6$ , se detecta en la capa de células granulares del cerebelo<sup>213,214</sup>.

Los receptores GABA<sub>C</sub> difieren de los receptores GABA<sub>A</sub> en algunas propiedades<sup>215</sup>. Se ha demostrado que los receptores GABA<sub>C</sub> son 7 veces más sensibles a la actuación de GABA que los receptores GABA<sub>A</sub>, y el tiempo de apertura de los canales de cloruro asociados a

## Introducción

receptores GABA<sub>C</sub> es aproximadamente 5 veces más largo que para los receptores GABA<sub>A</sub>. Esto quiere decir que los receptores GABA<sub>C</sub> no se desensibilizan con la aplicación prolongada de GABA, y que mantienen más tiempo abiertos los canales, ya que son más lentos cerrándolos que los receptores más frecuentes de GABA<sub>A</sub>.

Los receptores GABA<sub>C</sub> se localizan principalmente en células de la retina de vertebrados, aunque expresados de manera heterogénea. Son las subunidades  $\rho_1$  las que se localizan, principalmente, en la retina, mientras que las subunidades  $\rho_2$  se presentan también en cerebelo, tálamo, córtex temporal y frontal. En general, dentro del sistema ocular, las subunidades  $\rho$  se localizan en los axones de las células bipolares de los bastones, observándose agrupaciones de dichas subunidades en sitios postsinápticos. Esta distribución en la retina de los receptores GABA<sub>C</sub> y en otras zonas del tracto visual indica que estos receptores están implicados en el procesamiento temporal de la información visual.

Los genes de las distintas subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> se presentan agrupados en cromosomas formando los llamados "clusters". Estas subunidades forman clusters (agrupaciones) en 5 cromosomas distintos; así los genes de las subunidades  $\alpha_2$  (GeneID:2555; MIM:137140),  $\alpha_4$  (GeneID:2557; MIM:137141),  $\beta_1$  (GeneID:2560; MIM:137190) y  $\gamma_1$  (GeneID:2565; MIM:137166) se localizan en el brazo corto del cromosoma 4 (4p12), en el cromosoma 5 (5q33-q35) se localizan los genes de las subunidades  $\alpha_1$  (GeneID:2554; MIM:137160),  $\alpha_6$  (GeneID:2559; MIM:137143),  $\beta_2$  (GeneID:2561; MIM:600232),  $\gamma_2$  (GeneID:2566; MIM:137164),  $\pi$  (GeneID:2568; MIM:602729), en el cromosoma 15 (15q11-q12) están los genes de las subunidades  $\alpha_5$  (GeneID:2558; MIM:137142),  $\beta_3$  (GeneID:2562; MIM:137192),  $\gamma_3$  (GeneID:2567; MIM:600233), en el cromosoma X (Xq28) se localizan los genes de las subunidades  $\alpha_3$  (GeneID:2556; MIM:305660),  $\epsilon$  (GeneID:2564; MIM:300093),  $\theta$  (GeneID:55879; MIM:300349), e incluso las subunidades  $\rho_1$  (GeneID:2569; MIM:137161),  $\rho_2$  (GeneID:2570; MIM:137162) del denominado receptor GABA<sub>C</sub> forman un agregado en el cromosoma 6 (6q13-21). Sólo las subunidades  $\rho_3$  (GeneID:200959) y  $\delta$  (GeneID:2563; MIM:137163) tienen sus genes situados lejos de estas agrupaciones e incluso en distintos cromosomas a los anteriormente mencionados (3q11.2 y 1p36.3, respectivamente).

### **Receptores GABA<sub>B</sub><sup>216</sup>:**

Al contrario de lo que pasa con los receptores GABA<sub>A</sub>, los receptores GABA<sub>B</sub> están formados por 7 dominios transmembrana acoplados a un sistema de segundos mensajeros y canales de calcio y potasio a través de proteínas ligadoras del nucleótido de guanina (también llamadas proteínas G).

## Introducción

Los receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos reprimen el flujo de entrada de calcio por inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje tipo N y P/Q, a través de subunidades Gβγ y esto provoca la liberación del neurotransmisor<sup>217</sup>.

Pero los receptores GABA<sub>B</sub> no son sólo presinápticos, sino que también los hay postsinápticos, pero en este caso inducen la apertura de los canales de potasio tipo Kir3, aunque también actuando a través de la unión a la subunidad Gβγ, lo que provoca un flujo de entrada de potasio, que hiperpolariza la neurona postsináptica que, a su vez, constituye la fase tardía de los potenciales inhibitorios postsinápticos (PIPS)<sup>218</sup>.

El receptor GABA<sub>B</sub>, es menos complejo estructuralmente que los GABA<sub>A</sub>, con menos sitios de unión a moléculas:

- Sitio para el agonista no selectivo: GABA.
- Sitio para el agonista selectivo: 3-APPA.
- Sitio para el antagonista no selectivo: baclofén.
- Sitio para el antagonista selectivo: CGP35384.

Los receptores GABA<sub>B</sub> clonados muestran que existen dos subunidades distintas (GABA<sub>B(1)</sub> y GABA<sub>B(2)</sub>), que son necesarias para dar lugar a un receptor funcional. Estas subunidades a su vez presentan diversas isoformas. En cuanto a la estructura de las subunidades GABA<sub>B</sub>, se ha demostrado (en concreto en la subunidad GABA<sub>B(1)</sub>) que presenta similitud con receptores de la familia 3 de receptores acoplados a una proteína G (GPCRs), grupo al que pertenecen, entre otros, los receptores metabotrópicos de glutamato. De hecho, al igual que ocurre con la familia 3 de GPCRs, el agonista del receptor (en este caso GABA) se une al dominio extracelular de una de las subunidades (en este caso GABA<sub>B(1)</sub>), siendo el dominio extracelular de GABA<sub>B(2)</sub> el determinante del acoplamiento a proteínas G.

Estos receptores GABA<sub>B</sub> no se bloquean con bicuculina, pero se activan por baclofén y son bloqueados por los análogos fosfónicos y sulfónicos del baclofén.

Al igual que las subunidades ρ<sub>3</sub> y δ de los receptores GABA ionotrópicos, las subunidades de los receptores GABA<sub>B</sub> no se agrupan en una única región cromosómica sino que se localizan en cromosomas distintos. El gen de GABA<sub>B(1)</sub> (GeneID:2550; MIM:603540) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31) y el gen de la subunidad GABA<sub>B(2)</sub> (GeneID:9568; MIM:607340) se localiza en el brazo largo del cromosoma 9 (9q22.1-q22.3).

## 1.8.- GABA Y ENFERMEDAD

Como se ha comentado anteriormente GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio y para evitar patologías, el cerebro debe mantener un equilibrio entre neurotransmisores inhibidores y excitadores. Es por ello que, desequilibrios en la concentración de GABA en distintas partes del cerebro, desencadenan diversas patologías, entre las cuales cabe destacar:

### **Depresión:**

En pacientes con depresión aguda se comprobó, mediante estudios de espectroscopía con resonancia magnética, que presentan una reducción en las concentraciones GABA del córtex prefrontal y occipital<sup>219</sup>. Estos resultados podrían ser un reflejo de los efectos del estrés agudo, ya que el estrés psicológico parece que induce una regulación a la baja de la neurotransmisión GABAérgica prefrontal<sup>220</sup>, mientras que la baja concentración GABA total tendría relación con la reducción de la densidad y tamaño de las interneuronas GABAérgicas<sup>221</sup>.

Otro tipo de estrés como el crónico puede reducir la función del receptor GABA<sub>A</sub>, posiblemente debido a cambios en la síntesis del esteroide neuroactivo<sup>222</sup>.

Los suplementos de GABA ayudan a prevenir que los mensajes relacionados con el estrés, alcancen los centros motores del cerebro, así como ayudan a mejorar el humor general de los pacientes.

En el trastorno depresivo mayor se observa una reducción de los niveles GABA no sólo en el córtex occipital y prefrontal, sino en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma de estos pacientes. Estos datos se apoyan con estudios de neuroimagen y análisis de tejidos cerebrales humanos postmortem. Los bajos niveles de GABA en estos enfermos pueden estar relacionados con el déficit cortical de interneuronas GABAérgicas<sup>223</sup>.

De todas maneras hay evidencias que contradicen la hipótesis GABA de la depresión que incluyen la ausencia de efectos de los fármacos GABAérgicos en los síntomas depresivos centrales<sup>224</sup> y la concentración prefrontal normal de GABA en sujetos con trastorno depresivo mayor en remisión<sup>225</sup>.

### **Corea de Huntington:**

En enfermos de Huntington, estudiados a nivel microscópico, se ha observado una pérdida selectiva y precoz de pequeñas interneuronas espinosas GABAérgicas (tipo Golgi II) en los núcleos caudado y putamen, así como la pérdida de neuronas grandes del globo pálido<sup>226</sup>.

La consecuencia bioquímica de estas alteraciones es la bajada de la concentración del GABA y la disminución de la actividad GAD, que es el enzima responsable inmediato de su síntesis en caudado y putamen, y en menor medida, en pálido, núcleo subtalámico, córtex y tronco del encéfalo<sup>227</sup>.

A pesar de esto, los niveles de receptores en el estriado no están alterados o ligeramente disminuidos. Por el contrario en la sustancia negra el nivel de receptores GABA es el normal, e incluso en algunos casos, está aumentado<sup>228</sup>.

### **Parkinson:**

Existen también evidencias de la relación entre GABA y sus receptores con la enfermedad de Parkinson.

La aplicación de una antagonista en los receptores GABA provoca distinta respuesta en la generación de células dopaminérgicas dependiendo del tipo de receptor que reciba el tratamiento, así al administrar el antagonista a un receptor GABA<sub>A</sub> se producirá un incremento de las células dopaminérgicas, mientras que si el tratado es un receptor GABA<sub>B</sub>, lo que se provocará es un descenso en el número de estas células. La presencia de GABA, en cambio, no conlleva cambio alguno en la generación de células dopaminérgicas en las neuroesferas<sup>229</sup>.

La actividad que ejerce GABA sobre los precursores de neuronas dopaminérgicas se desconoce. No se sabe bien si está relacionado con un aumento/disminución en la generación del fenotipo dopaminérgico o con un aumento/disminución de la supervivencia de las células dopaminérgicas en presencia de GABA.

### **Esquizofrenia:**

Los estudios demuestran que en pacientes esquizofrénicos su tejido cerebral postmortem presenta alteraciones, principalmente reducción de la actividad neuronal GABA, aunque estos resultados no son consistentes puesto que los estudios postmortem están sujetos a posibles alteraciones<sup>230</sup>.

## Introducción

De todas maneras, los esquizofrénicos presentan una reducción significativa de interneuronas gabaérgicas en algunas zonas cerebrales, así como la disminución de actividad del enzima glutamato descarboxilasa. Esto contrasta con el aumento del número de receptores GABA<sub>A</sub> en las neuronas piramidales posiblemente para compensar el aumento en la liberación de glutamato y el mejor aprovechamiento del poco GABA que se sintetiza<sup>231</sup>. Además se observa un aumento en la presencia de la subunidad  $\gamma_2$  en los receptores GABA<sub>A</sub>, y al ser esta una subunidad cuya secuencia aminoacídica es fosforilable, reduciría la sensibilidad de cualquier receptor que la contenga a la activación por GABA.

### **Epilepsia:**

Los investigadores explican la aparición de crisis epilépticas por un desequilibrio de los neurotransmisores a favor de la excitación neuronal. Por ello los fármacos antiepilépticos tratan de aumentar la transmisión sináptica gabaérgica, o bien la concentración GABA, mediante la inactivación de la GABA transaminasa<sup>232</sup>.

En los pacientes con epilepsia lóbulo-temporal hay una pérdida de fibras tanto excitatorias como inhibitorias, si bien se aprecia una importante reducción de células en la zona hiliar del giro dentado que es rica en células GABAérgicas. En el giro dentado se encontró la expresión reducida de las subunidades  $\alpha_5$  y  $\delta$  del receptor GABA<sub>A</sub>, siendo estas las subunidades que median la conductancia tónica. De hecho, los cerebros de individuos epilépticos son hiperexcitables y menos sensibles a neuroesteroides que actúan sobre la subunidad  $\delta$  de los receptores GABA<sub>A</sub><sup>233</sup>.

### **Autismo:**

Numerosos estudios proponen al sistema GABAérgico como uno de los responsables del autismo. Los enzimas GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> responsables de la síntesis de GABA se encuentran disminuidos en el córtex y alterados en el cerebelo<sup>234,235,236,237</sup>. En cuanto a los receptores GABA<sub>A</sub> y los sitios de unión a benzodiazepinas en las regiones límbicas y en el córtex cingulado posterior, también ven reducido su número<sup>238,239</sup>. Por otro lado, en otras zonas como el giro fusiforme, se observa una reducción del número de receptores GABA<sub>A</sub>, solamente en las capas más superficiales, mientras que es normal en capas más profundas. Sin embargo, el número de sitios de unión a benzodiazepinas se ve disminuido, tanto en las capas superficiales como profundas del giro fusiforme lo que parece indicar que la información que pasa por las capas inferiores se modula igual que en los controles sanos, mientras que al pasar a capas más superficiales se modula con menos control inhibitorio<sup>240</sup>.

## **2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**

## **JUSTIFICACIÓN**

La hiperexcitabilidad neuronal es la base fisiopatológica de la migraña. Este fenómeno es el resultado de sumar los estímulos excitadores e inhibidores que actúan controlando los impulsos nerviosos. Entre los primeros, destacan los mediados por la acetilcolina y el glutamato. Entre los segundos, sobresale el GABA, cuyos receptores están codificados por una serie de genes sujetos a una enorme variabilidad genética que se ve reflejada tanto en la participación de enfermedades, como en la mediación de las diferentes respuestas a los medicamentos y que pueden estar condicionando genéticamente el riesgo de sufrir migraña. Dado que la migraña sigue el modelo complejo de enfermedades genéticamente determinadas, donde la influencia genética se ha demostrado al menos discretamente ( $OR \approx 2$ ) en los estudios de asociación genética de rastreo genético a gran escala y en los estudios de menor cobertura, la realización de un estudio de asociación genética dirigida a los genes candidatos funcionales puede mejorar los resultados de los trabajos de rastreo genómico. Del mismo modo, el empleo de núcleos familiares que segregan migraña puede disminuir la variabilidad genética de la muestra, lo que nos permitiría obtener señales de asociación con más potencia que con simples muestras de casos y controles.

## **HIPÓTESIS**

- Debido a que se ha demostrado la existencia de una excitabilidad anormal en ciertas áreas cerebrales durante las crisis de migraña, es preciso investigar la posible implicación de un neurotransmisor inhibitorio como el GABA y su relación con los procesos que ocurren durante la migraña. Más concretamente, las variantes genéticas que codifican las distintas subunidades de los receptores GABA ionotrópicos.

## **3.- OBJETIVOS**

## Objetivos

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Analizar la posible relación existente entre las distintas subunidades de receptores GABA y la migraña en familias que segregan migraña.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

I. Estudio de asociación haplotípica en los genes de las subunidades de los receptores GABA.

II. Comprobación en una muestra de casos y controles de las variantes destacadas en el estudio de asociación basado en familias.

III. Secuenciación de las regiones exónicas de los genes con polimorfismos que presenten cierto grado de asociación significativa.

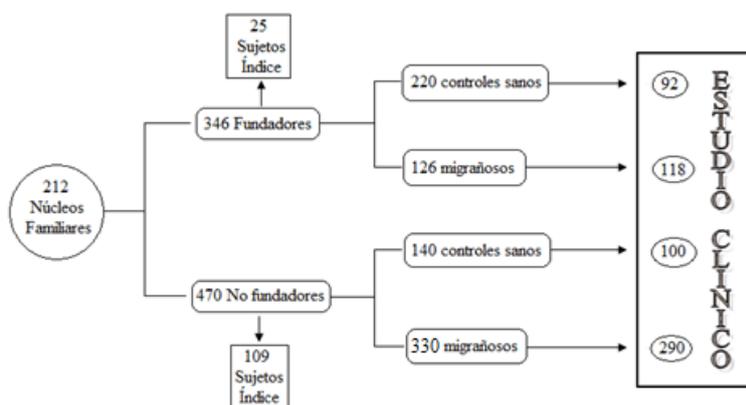
## **4.- MATERIAL Y MÉTODOS**

#### 4.1.- CARACTERÍSTICAS LAS POBLACIONES DE ESTUDIO

##### Población de base familiar:

Para el estudio se reclutaron 134 familias de etnia caucásica residentes en España, más concretamente en Cantabria, componiendo un total de 600 individuos a los que se diagnosticó en el Servicio de Neurología del Hospital Marqués de Valdecilla (Santander) como migrañosos y controles sanos. Dentro del grupo de migrañosos, se distinguieron aquéllos que sufrían aura (MCA) de los que no (MSA), siguiendo los criterios actuales de la IHS<sup>23</sup>. Dado que, como es de esperar, una gran proporción de casos que cumplían los criterios de MCA, también sufrían crisis de migraña sin aura, el fenotipo final asignado fue de MCA.

La selección de la muestra se realizó tras la identificación de los individuos “*propositus*”. Una vez categorizado a este paciente, denominado sujeto índice, se le ofreció participar en el estudio junto a sus familiares directos. En los casos en que fue posible, además de a parientes de primer grado, se invitó a formar parte de la investigación a sus familiares de segundo y tercer grado. Esta muestra consistió en 600 individuos de los cuales 408 eran migrañosos y 192 no migrañosos. En la Ilustración 1 se observan los casos índices (sujetos a partir de los cuales se formaron los árboles), los individuos fundadores (sujetos de los que se desconocen los genotipos parentales), así como el número final de individuos genotipados en este estudio.



**Ilustración 1: Esquema de la distribución de los individuos que participaron en el estudio familiar.**  
(Modificado de Oterino et al 2008)

**Poblaciones de réplica:**

○ **Muestra de casos y controles originarios de Cantabria:**

Para la replicación de los resultados positivos, se seleccionó una segunda muestra de migrañosos y controles sanos no relacionados entre sí procedentes de Cantabria. Esta muestra se compuso de un total de 739 individuos. En cuanto a la clínica 329 fueron clasificados como controles sanos (edad  $37,98 \pm 14,1$  años) y 410 como migrañosos (edad  $36,07 \pm 12,8$  años). De los pacientes, 180 cumplían criterios MSA y 230 criterios de MCA, siendo esta población seleccionada siguiendo los mismos criterios IHS que la muestra familiar. Se observa la existencia de un sesgo de selección en esta muestra a favor de los MCA frente a los MSA, esto se debe a que estas muestras proceden de los pacientes que visitan las consultas de un Hospital de tercer nivel al que llegan los casos más complejos.

Los pacientes se reclutaron en la consulta de neurología, mientras que los controles procedían de entre el círculo de amistades de los migrañosos o bien voluntarios procedentes de los Centros de Salud de la zona. No se reclutaron pacientes con otras patologías neurológicas como controles sanos.

○ **Muestra de casos y controles originarios de Galicia:**

Además de la réplica con casos y controles cántabros, se recogió muestras de otra región del norte de España, concretamente se seleccionó una muestra de casos y controles procedentes Galicia. Los migrañosos fueron clasificados siguiendo los mismos criterios IHS que en las otras poblaciones cántabras estudiadas. La muestra gallega constaba de 345 controles sanos (edad  $51,10 \pm 15,957$  años) y 367 migrañosos (edad  $45,93 \pm 13,018$  años). De los pacientes, 213 cumplían criterios MSA y 154 criterios de MCA. Puede objetivarse la existencia de un pequeño sesgo de selección en los controles sanos de la muestra gallega, ya que su edad media fue de unos 10 años superior a la edad media de los migrañosos, a la hora de calcular los resultados de este estudio se trató de minimizar este sesgo mediante restricciones en el rango de edad de los controles sanos.

## **4.2.- CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Todos los individuos que participaron en este estudio fueron informados y firmaron su consentimiento para la obtención de sus muestras y uso de los datos clínicos con fines de investigación (Anexo I).

El protocolo para los distintos experimentos de este trabajo de investigación, fue valorado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica del Hospital Marqués de Valdecilla e IDIVAL. El estudio se inició en 2006 como parte del proyecto FISS (PI05/0386), FISS (PI06/90496) y continuó hasta 2015 (PI11/01232), proyectos todos ellos aprobados por el Comité de ética.

#### 4.3.- RECOGIDA DE DATOS

Cada uno de los individuos de las familias participantes rellenaron un cuestionario en el que se les preguntaba sus datos demográficos, antecedentes clínicos que pudieran ser de interés como por ejemplo hipertensión, hipercolesterolemia, alergias, trastornos cardiovasculares, epilepsia, temblores, consumo de alcohol y tabaco o trastornos psiquiátricos (depresión o ansiedad), así como sobre si padecían o no cefaleas y las características de las mismas en caso de padecerlas, con el fin de categorizar el estado clínico conforme a los grupos planteados (ver Tabla 10).

	Grupos clínicos (Frecuencia)			
	MCA	MSA	Controles Sanos	Total
Sexo				
Mujeres	152 (0,768)	117 (0,741)	265 (0,709)	534 (0,732)
Hombres	46 (0,232)	41 (0,259)	109 (0,291)	196 (0,268)
Total	198	158	374	730
Síntomas clínicos				
Edad media de comienzo	15	14,5		
Náuseas / Vómitos (%)				
Leve o moderado	47	41		
Grave	53	59		
Frecuencia de las crisis <sup>1</sup> (%)				
< 1 al mes	25	18		
1-4 al mes	46	49		
> 4 al mes	29	33		
Intensidad del dolor <sup>2</sup> (%)				
Leve o moderado	16	16		
Grave	84	84		
Agravamiento menstrual <sup>3</sup>				
Sí	63	64		
No	37	36		

**Tabla 10: Distribución de los grupos de la muestra familiar por sexo y clínica. (Modificado de Oterino et al 2008).**

<sup>1</sup> Frecuencia de los ataques de migraña en los últimos 3 meses.

<sup>2</sup> La intensidad del dolor se consideraba grave si el paciente necesitaba dejar de su actividad durante una crisis sin tratamiento.

<sup>3</sup> Se considera que sí en las mujeres que tenían más crisis coincidiendo con la menstruación.

#### **4.4.- EXTRACCIÓN DE ADN**

A todos los participantes del estudio se les extrajo el ADN a partir de linfocitos de sangre periférica, extraída en tubos Vacutainers® con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (BD Vacutainer Systems, UK). La extracción de ADN se realizó de manera inmediata a su recogida, en los casos en los que esto no fue posible, se conservó a una temperatura de 4°C durante un tiempo nunca superior a dos días.

La sangre fue procesada utilizando el paquete comercial “Wizard Genomic DNA Purification System” (Promega Corporation, EEUU) siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial para la obtención y purificación de ácidos nucleicos a partir de sangre total<sup>241</sup> (ver Tabla 11), que permite obtener muestras de ADN con la calidad necesaria para la realización posterior de PCRs. Este proceso de aislamiento de ADN en células blancas consta de 4 fases bien diferenciadas:

Fase 1: En el primer paso, la adición a la sangre total de una solución de lisis celular provoca la rotura de eritrocitos consiguiendo un precipitado blanco.

Fase 2: Sobre este precipitado se añade una solución de lisado de núcleos y posteriormente una solución de precipitación de manera que conseguimos la rotura de los núcleos celulares con la consiguiente liberación del ADN y la precipitación salina de las proteínas. El ADN de alto peso molecular se presenta en una solución acuosa.

Fase 3: En el último paso se procede a la concentración y eliminación de sales que pueda presentar este ADN y para ello se realizan sucesivas precipitaciones con 2-propanol y etanol.

Fase 4: Una vez que se obtiene el ADN sin sales y seco, se disuelve en la disolución de Tris-EDTA (TE) para rehidratarlo y se pasa a un tubo ‘eppendorf’ debidamente identificado con el código del paciente y almacenado en un congelador a -20°C, a la espera de ser utilizado.

## Material y Métodos

- 1) Añadir 9ml de solución de lisis celular a 3ml de sangre.
- 2) Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 3) Centrifugar a 3.500 r.p.m durante 10 minutos.
- 4) Descartar el sobrenadante y vortear el pellet.
- 5) Añadir 3ml de solución de lisis nuclear y mezclar.
- 6) Incubar a 37°C durante 10 minutos.
- 7) Añadir 1ml de solución para precipitar proteínas.
- 8) Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 10 minutos.
- 9) Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo con 3ml de isopropanol.
- 10) Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 1 minuto.
- 11) Eliminar el sobrenadante y añadir 3ml de etanol al 70%.
- 12) Centrifugar a 3.500 r.p.m. durante 1 minuto.
- 13) Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet al aire.
- 14) Rehidratar con 250ml de solución de rehidratación o Tris-EDTA.
- 15) Mantener a 4°C durante 24horas.
- 16) Pasar a un eppendorf debidamente etiquetado y almacenar a -20°C

**Tabla 11: Protocolo extracción de ADN a partir de sangre total (Promega).**

### 4.5.- SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS

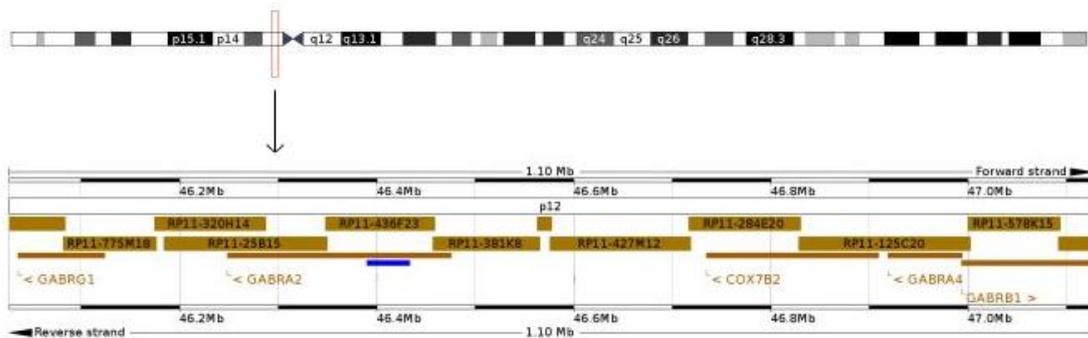
Dentro de la fisiopatología de la migraña, GABA juega un papel importante. GABA actúa a través de receptores ionotrópicos ( $GABA_A$ ) y metabotrópicos ( $GABA_B$ ). Los receptores  $GABA_A$  son miembros de la superfamilia de los LGIC que están formados por cinco subunidades homólogas que se disponen alrededor de un canal de iones cloruro central. Hay 19 genes de las distintas subunidades de receptores ionotrópicos existentes ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta_1$ ,  $\epsilon_1$ ,  $\eta_{1-2}$ ,  $\pi_1$ ,  $\theta_1$  y  $\rho_{1-3}$ ). Cada una de las subunidades presenta sitios de unión a distintas moléculas.

Por todo ello resulta interesante estudiar la influencia de las variantes genéticas que codifican las diferentes subunidades de los receptores  $GABA_A$ . Para ello se seleccionaron polimorfismos de nucleótido simple dentro de estos genes con el fin de comprobar si algún cambio nucleotídico podría afectar a la funcionalidad de los receptores y ser responsables de una mayor susceptibilidad a la migraña o bien conferir protección al individuo que lo presenta.

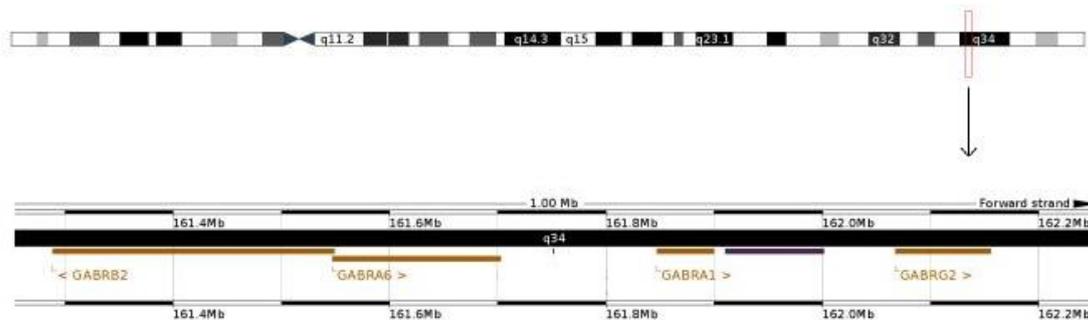
Los genes que codifican las subunidades de los receptores  $GABA_A$  se localizan en 5 cromosomas principalmente: 4, 5, 6, 15 y X. Los genes GABA presentes en los cromosomas 15 ( $GABRB3$ ,  $GABRA5$  y  $GABRG3$ ) y X ( $GABRE$ ,  $GABRA3$  y  $GABRQ$ ), ya han sido estudiados en migraña. Sin embargo, no hay datos de las subunidades codificadas por los genes GABA de los cromosomas 4 ( $GABRG1$ ,  $GABRA2$ ,  $GABRA4$  y  $GABRB1$ ), 5 ( $GABRB2$ ,  $GABRA6$ ,  $GABRA1$  y

## Material y Métodos

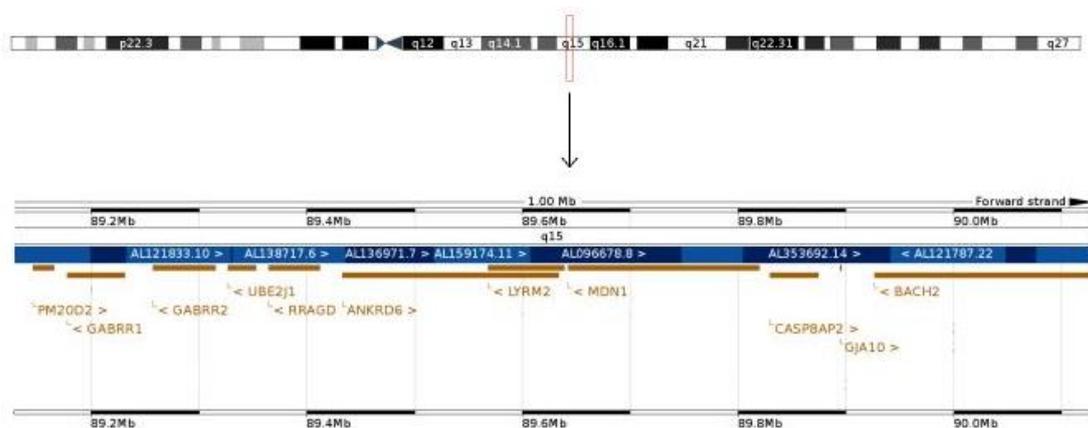
GABRP) y 6 (GABRR1 y GABRR2). Serán estos último, el objeto de estudio de este trabajo. La distribución en agregados en los distintos genes que se analizarán en este trabajo puede verse en las siguientes ilustraciones:



**Ilustración 2: Localización de los genes *GABRG1*, *GABRA2*, *GABRA4* y *GABRB1* en el cromosoma 4 (*locus* 4p12).**



**Ilustración 3: Localización de los genes *GABRB2*, *GABRA6*, *GABRA1* y *GABRG2* en el cromosoma 5 (*locus* 5q34).**



**Ilustración 4: Localización de los genes *GABRR1* y *GABRR2* en el cromosoma 6 (*locus* 6q15).**

#### **4.6.- SELECCIÓN DE POLIMORFISMOS (SNPs)**

La selección de polimorfismos a estudiar se realizó a través del índice del proyecto HapMap (HapMap Genome Browser versión 27, fase II)<sup>242,243,244</sup>. El proyecto HapMap consiste en la compilación del genoma humano que permite desarrollar mapas de haplotipos y facilita el estudio de genes mediante la selección de polimorfismos informativos. A través de este proyecto HapMap, se identificaron los polimorfismos de un único nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) más informativos de los genes de receptores GABA (SNPs guía), con una frecuencia mínima del alelo menos frecuente de 0,2.

Material y Métodos

GEN	Crom	Base (ncbi v.37)	SNP (rs#)	CELERA (hCV#)	Sonda [alelo1/alelo2]
<i>GABRG1</i>	4	46038745	12374299	26376687	[A/T]
<i>GABRG1</i>	4	46055623	13140445	31099109	[G/T]
<i>GABRG1</i>	4	46087272	1826923	11689762	[G/T]
<i>GABRG1</i>	4	46105928	1497559	8840637	[A/G]
<i>GABRA2</i>	4	46256712	3822051	11278722	[C/T]
<i>GABRA2</i>	4	46311035	279864	7537210	[C/T]
<i>GABRA2</i>	4	46313309	279862	1027166	[G/T]
<i>GABRA2</i>	4	46355479	12647055	26148114	[C/T]
<i>GABRA2</i>	4	46366067	1442066	7536946	[A/G]
<i>GABRA2</i>	4	46368641	3849591	8262282	[G/T]
<i>GABRA2</i>	4	46371833	9291283	8262290	[A/G]
<i>GABRA2</i>	4	46385578	16859354	8262310	[G/T]
<i>GABRA2</i>	4	46393160	6856130	27851505	[A/G]
<i>GABRA2</i>	4	46396198	1372472	7537281	[A/T]
<i>GABRA4</i>	4	46922950	9291296	26148195	[A/G]
<i>GABRA4</i>	4	46928746	6447517	1592524	[A/T]
<i>GABRA4</i>	4	96951781	13140528	1592556	[A/G]
<i>GABRA4</i>	4	46952471	1512130	8262795	[A/G]
<i>GABRA4</i>	4	46972899	2271429	15960220	[G/T]
<i>GABRA4</i>	4	46993562	11735333	30837226	[C/G]
<i>GABRA4</i>	4	46994495	3792211	1592599	[A/C]
<i>GABRA4</i>	4	47002378	6447520	1592613	[C/T]
<i>GABRA4</i>	4	47003076	1159315	1592615	[A/G]
<i>GABRA4</i>	4	47003829	4695187	1592619	[G/T]
<i>GABRA4</i>	4	47004305	1512142	8262736	[C/T]
<i>GABRB1</i>	4	47225928	1470208	8263260	[C/T]
<i>GABRB1</i>	4	47322219	6284	11353524	[A/C]
<i>GABRB1</i>	4	47382920	4695226	2119841	[A/C]
<i>GABRB1</i>	4	47407213	4695229	3236176	[A/G]

Material y Métodos

GEN	Crom	Base (ncbi v.37)	SNP (rs#)	CELERA (hCV#)	Sonda [alelo1/alelo2]
<i>GABRB2</i>	5	16756625	187269	917945	[A/G]
<i>GABRB2</i>	5	165759956	1816071	3099123	[A/G]
<i>GABRB2</i>	5	160855635	7707429	509511	[C/G]
<i>GABRB2</i>	5	160952734	17522737	26311645	[A/G]
<i>GABRA6</i>	5	161114522	4454083	220485	[C/T]
<i>GABRA6</i>	5	161116942	3811992	220488	[C/T]
<i>GABRA6</i>	5	161128409	3811991	109979	[G/T]
<i>GABRA6</i>	5	161137608	10058132	249886	[A/C]
<i>GABRA1</i>	5	161269895	4596421	26056766	[C/T]
<i>GABRA1</i>	5	161302211	4428455	26181842	[A/G]
<i>GABRA1</i>	5	161306946	12187575	30880091	[A/C]
<i>GABRA1</i>	5	161309303	4921199	11257572	[A/G]
<i>GABRP</i>	5	170210820	929762	3165049	[C/T]
<i>GABRP</i>	5	170230688	10054743	30313064	[A/G]
<i>GABRP</i>	5	170232614	2303135	3165004	[C/T]
<i>GABRP</i>	5	170233262	1862242	11158381	[A/G]
<i>GABRR1</i>	6	89877116	393203	2341856	[G/T]
<i>GABRR1</i>	6	89878461	1331100	8945651	[A/G]
<i>GABRR1</i>	6	89879296	1757815	1757815	[A/T]
<i>GABRR1</i>	6	89882186	9362622	29516719	[C/T]
<i>GABRR1</i>	6	89883771	7742968	28979807	[A/C]
<i>GABRR1</i>	6	89885206	13202074	30748831	[A/G]
<i>GABRR1</i>	6	89894016	2183648	16150269	[C/G]
<i>GABRR1</i>	6	89898115	9294424	30094511	[A/C]
<i>GABRR1</i>	6	89902087	10944436	11420711	[A/G]
<i>GABRR1</i>	6	89913520	2150817	15832474	[A/G]
<i>GABRR1</i>	6	89914187	2183797	2729547	[A/G]
<i>GABRR1</i>	6	89877116	2297389	16186543	[C/T]

Material y Métodos

GEN	Crom	Base (ncbi v.37)	SNP (rs#)	CELERA (hCV#)	Sonda [alelo1/alelo2]
<i>GABRR1</i>	6	89916843	9444675	2729559	[C/T]
<i>GABRR1</i>	6	89917803	881293	2729560	[C/G]
<i>GABRR1</i>	6	89921623	9353653	29860145	[C/T]
<i>GABRR1</i>	6	89925740	6902106	28979817	[A/C]
<i>GABRR1</i>	6	89926966	12200969	11420642	[C/T]
<i>GABRR2</i>	6	89967498	282129	2332356	[C/T]
<i>GABRR2</i>	6	89967855	282128	8945550	[A/G]
<i>GABRR2</i>	6	89980083	282121	272531	[A/G]
<i>GABRR2</i>	6	89994698	9362632	9866022	[C/G]
<i>GABRR2</i>	6	90001465	7762767	9866005	[C/T]
<i>GABRR2</i>	6	90005925	2148174	1269058	[C/T]
<i>GABRR2</i>	6	90026794	7744352	30202521	[A/G]

**Tabla 12: Listado de SNPs genotipados.**

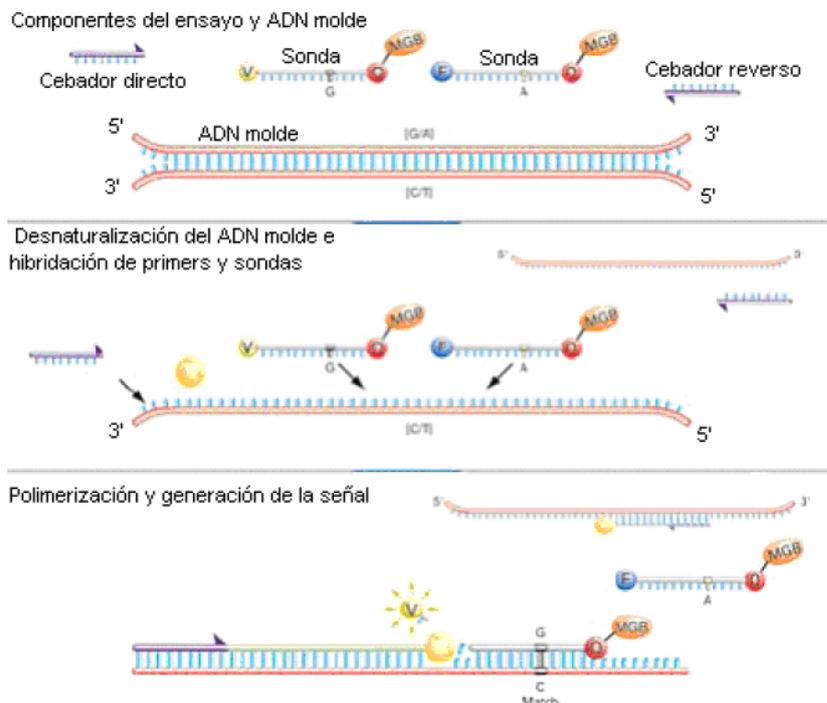
#### 4.7.- ESTUDIO GENOTÍPICO

El genotipado de los polimorfismos se llevó a cabo mediante ensayos de TaqMan® prediseñados (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, CA. EEUU) específicos para los polimorfismos seleccionados en los distintos genes de receptores GABA. Estos ensayos detectan variantes en una secuencia de ácidos nucleicos sin cuantificar la diana.

Cada ensayo de genotipado TaqMan contiene una pareja de cebadores específicos para amplificar la secuencia polimórfica de interés, dos sondas MGB (*minor groove binder*) para distinguir los dos alelos del polimorfismo. Cada sonda MGB lleva unida en su extremo 5' un fluorocromo informador que servirá para identificar el nucleótido de la muestra. Este fluorocromo será VIC en el caso de la sonda encargada de detectar el alelo 1 del SNP y FAM en la sonda encargada de detectar el alelo 2. En el extremo 3' la sonda MGB se encuentra una molécula MGB que se une al surco menor de la hélice de ADN. Esta incorporación aumenta la temperatura de fusión ( $T_m$ , *melting temperature*) para una sonda de una longitud determinada y mejora la hibridación porque estabiliza el complejo sonda/ADN molde. El aumento de la estabilidad de la unión permite usar sondas más cortas (de hasta 13 bases)<sup>245,246</sup>; lo que genera mayores diferencias en los valores de  $T_m$  entre sondas complementarias y no-complementarias. La diferencia en un sólo nucleótido entre la sonda y la secuencia de interés disminuirá la eficiencia de hibridación de la sonda y el ADN molde, lo cual permite conseguir una discriminación alélica más robusta. Todas las sondas MGB incluyen además una molécula inhibidora de la fluorescencia conocida como *quencher* (NFQ, *non-fluorescent quencher*) en el extremo 3', que proporciona una mejor relación señal/ruido y, por tanto, consigue una mayor sensibilidad.

Durante la reacción de PCR, cada sonda TaqMan MGB, hibridará específicamente con su secuencia complementaria, y la ADN polimerasa empezará a polimerizar desde los cebadores unidos al ADN molde hasta llegar al extremo 5' de la sonda hibridada con la hebra de ADN molde. En ese momento, la actividad exonucleasa de la AmpliTaq Gold, romperá únicamente las sondas que hayan hibridado con la secuencia diana lo cual provocará la separación del fluoróforo informador del quencher o apantallador y, por tanto, llevará a un aumento de fluorescencia por parte del informador, y esa señal fluorescente, generada por la amplificación de la PCR, indicará qué alelos están presentes en la muestra. Por el contrario, cuando la sonda no se une a la secuencia diana, permanecerá intacta y la proximidad del fluoróforo reportero al apantallador hará que no se emita fluorescencia, porque ésta es transferida del fluoróforo reportero al apantallador mediante transferencia de energía de tipo

Föster<sup>247,248</sup> (FRET; *Föster resonant energy transfer*). Las reacciones llevadas a cabo de explicar en la Ilustración 5.



**Ilustración 5: Fundamento de la técnica de genotipado por sondas TaqMan. Modificado de TaqMan SNP Genotyping Assays Protocol.**

Para el genotipado con sondas TaqMan se utilizaron placas de PCR de 96 pocillos a las que se les añadió la siguiente cantidad de reactivo por pocillo (Tabla 13).

Reactivos	Volumen (en $\mu\text{L}$ )	
	Pocillo	Placa (con un 10% de exceso)
Premix Ex Taq (Perfect Real Time)		
· Premix Ex Taq (2x)	2,81	295
· Rox Reference Dye (50x)	0,10	10,5
TaqMan SNP Genotyping Assay (20x)	0,09	9,5
ADN	2	-

**Tabla 13: Volúmenes de reacción empleados para la PCR previa a la discriminación alélica.**

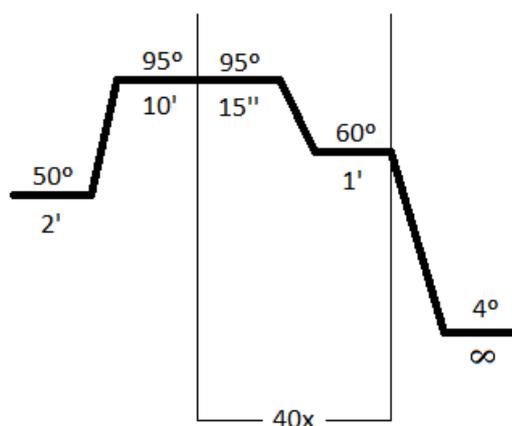
En cada una de las placas se analizaron 88 muestras y 8 controles negativos, además se realizaron duplicados al azar para confirmar la fiabilidad de los resultados.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada por Kary Mullis<sup>249</sup> que permite amplificaciones de pequeñas cantidades de ADN molde, llegando a conseguir más de un millón de copias de dicho fragmento diana en ciclos sucesivos.

Para ello es necesario que el ADN molde de doble cadena pase por una serie de fases e interactúe con diversas moléculas. En la primera fase del proceso es necesario alcanzar una elevada temperatura (93-97°C) que permita la desnaturalización o separación de hebras de ADN (fase de desnaturalización). El hecho de que la PCR comience a altas temperaturas minimiza la pérdida de primers por uniones inespecíficas y la dimerización de los mismos previa al comienzo de la misma.

La separación de hebras permite que los cebadores se unan a la secuencia complementaria que se encuentra en la cadena molde, en esta fase denominada fase de anillamiento la temperatura debe ser más baja (50-65°C) para facilitar la unión de las secuencias nucleotídicas. Una vez unidos los cebadores a la cadena gracias a la actuación de la ADN polimerasa se producirá la elongación de la nueva hebra complementaria (fase de elongación). Esta fase se produce a una temperatura más elevada (alrededor de los 72°C), sin perder rendimiento, gracias a que la polimerasa procedente de especies termófilas es capaz de añadir nucleótidos a elevadas temperaturas. Estas 3 fases se repiten un número "x" de ciclos, de manera que se elevará exponencialmente el número de copias obtenidas del fragmento deseado. No es conveniente que el número de repeticiones sea muy alto ya que la eficiencia de la polimerasa baja y puede llevar a error.

Cada estudio es distinto, por ello es necesario poner a punto la PCR previamente, probando distintas temperaturas y número de ciclos, hasta conseguir la amplificación perfecta del segmento a estudio. En el caso del genotipado de SNPs los parámetros empleados para su realización son los que se indican en la Ilustración 6.

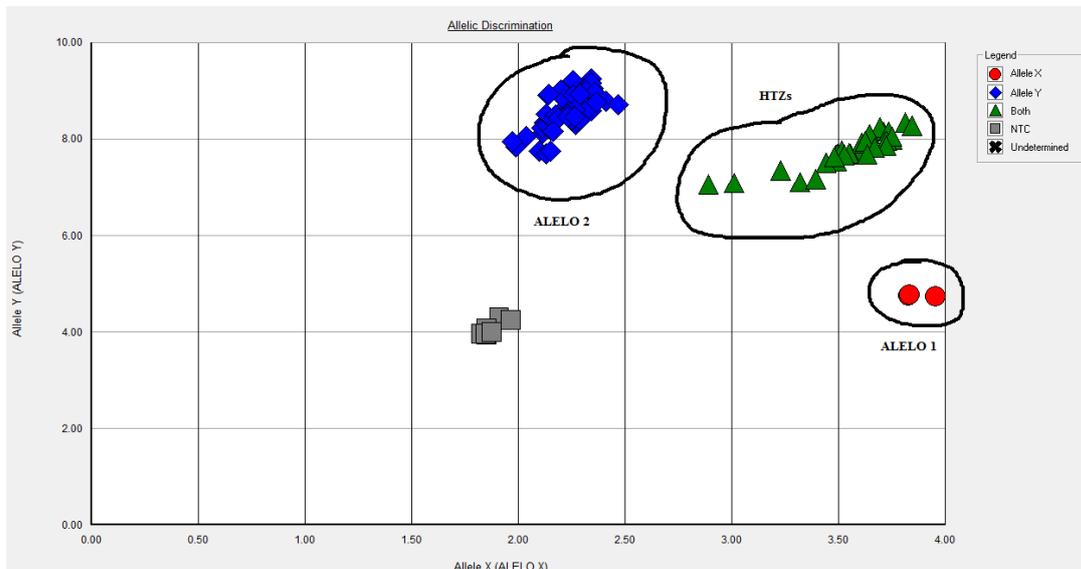


**Ilustración 6: Parámetros del termociclador para la PCR previa a la discriminación alélica.**

La PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA), disponible en el laboratorio de Neurología.

Posteriormente a la amplificación de los fragmentos, se realizó la discriminación alélica de las muestras con el programa informático Sequence Detection Software (SDS) versión 1.3.1.21 del instrumento de PCR en tiempo real 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA).

La designación de alelos se hizo manualmente asignando el alelo 1 al grupo de muestras que se localizaban en el eje X y que se refiere a las marcadas con la sonda VIC (homocigotos para el alelo 1), y el alelo 2 corresponde al grupo de muestras que se localizan en el eje Y, que están marcadas con la sonda FAM (homocigotos para el alelo 2). Las muestras del grupo intermedio entre los ejes X e Y son los heterocigotos con presencia tanto del alelo 1 como del alelo 2. Además, en el gráfico de resultados aparece una agrupación de muestras sin marcaje que corresponde a los controles negativos incluidos en las placas y, en algunos casos, otros puntos fuera de los grupos principales que son muestras denominadas “indeterminadas”, que por alguna causa (poca cantidad o calidad de muestra, error en el pipeteo, suciedad en el pocillo, mal calibrado del equipo, etc) no tuvieron una correcta amplificación y que fueron repetidas en posteriores experimentos (Ilustración 7).



**Ilustración 7: Ejemplo de la interpretación de resultado de discriminación alélica.**

#### 4.8.- SECUENCIACIÓN

Se realizó la secuenciación de todos los exones y secuencias flanqueantes (500 bp en cada extremo) de los genes que codifican las subunidades GABRR1 y GABRR2. Para ello se diseñaron los primers con el programa PrimerQuest Tool (disponible en [www.eu.idtdna.com](http://www.eu.idtdna.com)), obteniendo como resultado 56 primers en el caso del gen GABRR1 y 42 primers para GABRR2 (ver anexo II). Con ellos se cubre todos los exones de dichos genes.

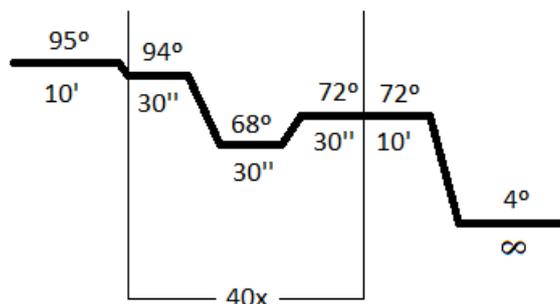
Se seleccionaron 19 pacientes tanto casos como controles que presentaban el haplotipo de riesgo y otro, con el fin de comprobar si alguno de los SNPs de ese haplotipo recogía la información de alguna mutación exónica que tuviese relación con el fenotipo migraña.

Para ello se realizaron las PCRs correspondientes a los 49 pares de primers con las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen por muestra
Primer F	1 $\mu$ l
Primer R	1 $\mu$ l
Buffer	2,5 $\mu$ l
Cl <sub>2</sub> Mg	1,5 $\mu$ l
dNTPs Invitrogen	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	17,375 $\mu$ l
Taq polimerasa Boline	0,125 $\mu$ l
DNA genómico	1 $\mu$ l

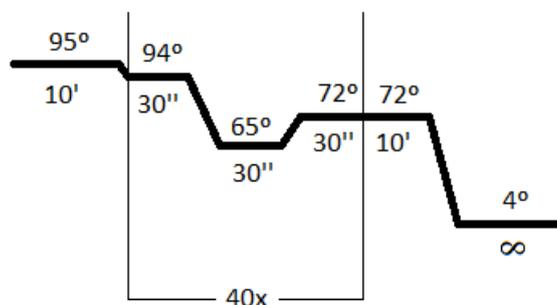
**Tabla 14: Condiciones de la PCR para secuenciación.**

Los primers 9-10, 23-24, 55-56 de GABRR1 se amplificaron en las siguientes condiciones:



**Ilustración 8: Condiciones del termociclador para los primers 9-10, 23-24 y 55-56 de GABRR1.**

El resto de primers de GABRR1 y todos los de GABRR2 se procesaron de acuerdo al siguiente protocolo:



**Ilustración 9: Condiciones del termociclador para los primers de GABRR1 (en general) y GABRR2.**

Una vez realizadas las PCRs, se comprobó que habían salido correctamente separando los productos de PCR en un gel de agarosa al 2%, y se confirmó que el tamaño de cada banda correspondía con la que debería salir según la pareja de primers empleados. Estas muestras fueron posteriormente purificadas con el enzima ExoSAP-IT y comprobado que sólo existía la banda correcta y se habían eliminado el exceso de primers y PCRs incompletas mediante un gel de agarosa al 2%.

Después de ello, las muestras fueron remitidas al servicio de secuenciación de Dismed que mediante secuenciación Sanger y con los primers empleados en la PCR obtuvieron las secuencias de los fragmentos de PCR enviados.

Por último, dichos fragmentos fueron analizados uno a uno mediante el programa Chromas v.2011 (Technelysium Pty Ltd) y sus secuencias alineadas junto con una secuencia consenso por el programa ClustalW (EMBL-EBI) con el fin de comprobar los cambios en los nucleótidos.

#### 4.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de analizar los pedigríes bajo diferentes modos de herencia (dominante, recesivo y aditivo), se realizó el análisis de asociación de base familiar (FBAT). El planteamiento unificado de los test de asociación genética, introducidos por Rabinowitz y Laird<sup>250</sup> está construido sobre el método original TDT (Transmission Disequilibrium Test)<sup>251</sup> en el cual los alelos transmitidos a los afectados se comparan con la distribución esperada de alelos entre la descendencia. Este método pone en el mismo marco de trabajo diferentes modelos genéticos, tests con padres no disponibles, y test con diferentes hipótesis nulas. La distribución esperada se deriva de la 2ª ley de Mendel de segregación y condicionamiento sobre los estadísticos suficientes para cualquier parámetro de ruido o sesgo bajo la hipótesis nula. De este modo, se evitan sesgos debido a la mala especificación del modelo o mezcla o estratificación poblacional.

La aproximación FBAT ([www.hsph.harvard.edu/fbat/fbat.htm](http://www.hsph.harvard.edu/fbat/fbat.htm)) utiliza datos de núcleos familiares, hermanos, o una combinación de los dos, para analizar el ligamiento y el desequilibrio de ligamiento. Se obtuvo un valor de significación global utilizando el procedimiento de permutación implementado en el algoritmo HBAT. Sólo se analizaron aquellos alelos presentes en al menos 10 familias. Una vez que hemos obtenido los p-valores individuales permutados para cada uno de los valores, utilizamos el algoritmo SFDR (<http://www.utstat.toronto.edu/sun/Software/SFDR>) para corregir el análisis múltiple, teniendo en cuenta los mapas de posición de los marcadores. Los p-valores se fijaron a 0,05 para significación nominal. Debido a que usamos distintos modelos, el error alfa se estableció en 0,01.

El análisis de haplotipos se realizó mediante el algoritmo HAPSTAT<sup>252,253</sup>, que usa el algoritmo de Newton-Raphson y el de expectación-maximización para estimar el efecto de los haplotipos, lo que permite estimar los efectos de haplotipos y covariables ambientales e interacciones entre haplotipos y ambiente mediante modelamiento de regresión. Para los rasgos binarios emplea la regresión logística. Se plantean diferentes escenarios de análisis bajo modelos de herencia aditivo, recesivo y dominante o codominante. Bajo el modelo aditivo, se asume que el efecto es doble si el sujeto tiene doble copia del alelo. Bajo el modelo dominante, el tener una o dos copias supone el mismo efecto, y para el recesivo sólo tener dos copias del mismo alelo causal influirá en el fenotipo.

**Consideraciones muestrales:**

TDT: La computación del tamaño muestral se realizó mediante el algoritmo de Purcell S et al<sup>254</sup>.

En este caso, el uso de 212 núcleos familiares nos permite obtener una potencia mayor de 0,8 con un riesgo alfa de 0,01, asumiendo una frecuencia del alelo asociado de 0,20 en desequilibrio de ligamiento de 1,0 con el *locus* a estudio.

Casos y controles: para obtener una potencia de 0,8 con un riesgo alfa=0,01 se precisan 345 casos y 345 controles, asumiendo una frecuencia del alelo asociado de 0,20 en desequilibrio de ligamiento de 1,0 con el *locus* a estudio.

## **5.- RESULTADOS**

### **Genotipado:**

Se estudiaron 212 núcleos familiares con un total de 600 individuos, de los cuales 408 que cumplían criterios de migraña (232 MSA y 176 MCA) y 192 no eran migrañosos.

En la plataforma HapMap se introdujeron los nombres de los genes a analizar y tras aplicar las condiciones indicadas en el apartado de material y métodos se obtuvo una lista de 71 *tag* SNP o SNPs informativos que fueron genotipados en la muestra familiar.

La distribución genotípica observada, correspondiente a los 71 SNPs del estudio, se comparó frente a la distribución esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg. Del total de SNPs analizados, 4 presentaban diferencias significativas entre los resultados observados y los esperados de modo que estaban en desequilibrio de Hardy Weinberg y fueron excluidos de los posteriores análisis. Los SNPs excluidos fueron rs2150817 de *GABRR1*, rs4695229 de *GABRB1*, rs13140445 de *GABRG1* y rs929762 de *GABRG2*.

No se detectó ningún otro factor que pudiera crear confusión y que afectara al genotipo o a las frecuencias alélicas de la población en estudio pudiendo restar validez a los resultados obtenidos.

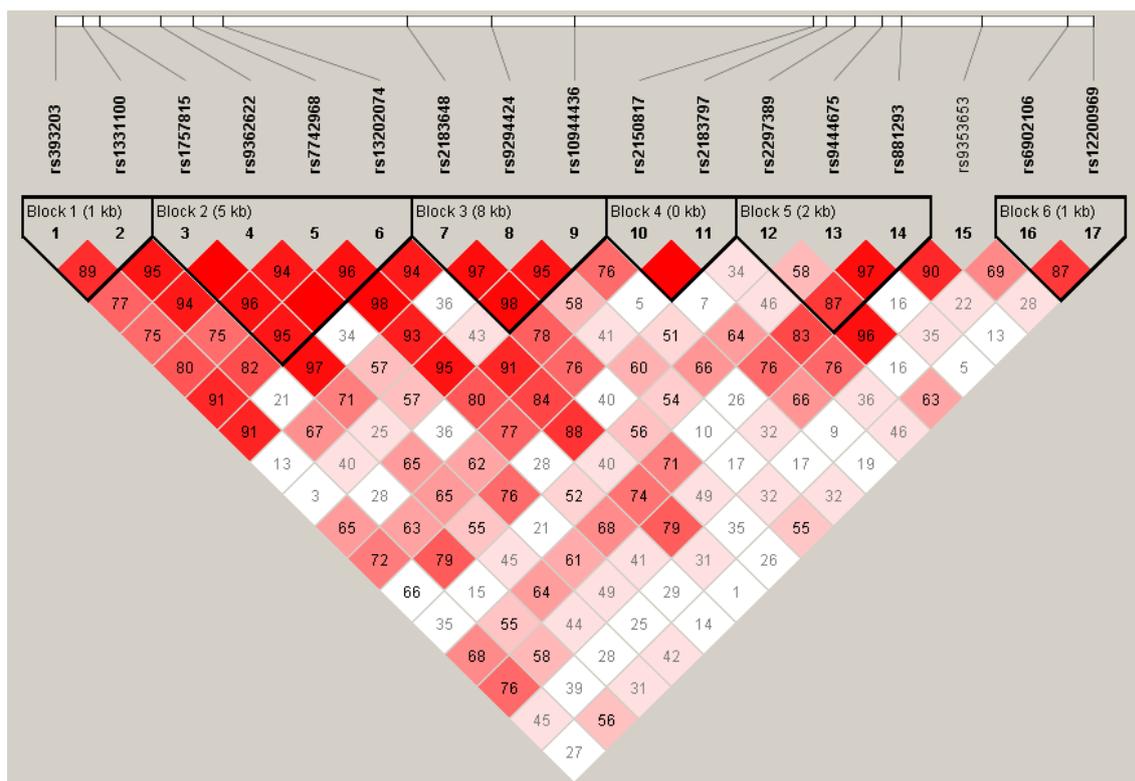
En el análisis con el programa Haploview, ninguno de los 67 SNPs estudiados por sí solo dio resultados significativos tras corrección por FDR, pero sí algunos significación nominal. En el estudio de haplotipos observamos dos resultados positivos en la agrupación del cromosoma 4, en los genes *GABRG1*, donde el haplotipo TGG, construido con los SNPs rs12374299-rs13140445-rs1826923 y tras 10000 permutaciones se obtiene un p-valor= 0,0325, y en el gen *GABRA2* el haplotipo GGATA, obtenido de la combinación de los polimorfismos rs1442060-rs3849591-rs9291283-rs16859354-rs6856130, y tras 10000 permutaciones dan un p-valor de 0,0397. Ninguno de estos valores significativos se sostiene si se aumenta el número de correcciones de la muestra.

Posteriormente, el análisis de los resultados obtenidos tras aplicar el algoritmo del programa FBAT, de aplicación en familias, que permite analizar núcleos familiares de distinto tamaño, dio resultados significativos en *GABRG1*, *GABRB2*, *GABRA6*, *GABRA2*, *GABRA1*, *GABRR1*, *GABRR2* (Tablas de resultados en el anexo III).

Estos resultados se calcularon bajo distintos modelos de herencia (aditivo, recesivo y dominante) y posteriormente, para comprobar la consistencia de dicha significación, se realizó una corrección de SFDR para evitar falsos positivos.

## Resultados

La construcción de los haplotipos se llevó a cabo mediante la combinación de los SNPs genotipados pertenecientes a distintos bloques de desequilibrio de ligamiento dentro del mismo gen. Estos bloques se obtuvieron mediante el programa Haploview, que si bien no dio resultados excesivamente consistentes tras corrección debido a la pérdida de datos que provoca su algoritmo, es de mucha utilidad a la hora de definir los distintos bloques de ligamiento del gen en estudio (ver por ejemplo para *GABRR1* en la Ilustración 10 y en el anexo IV, los bloques de desequilibrio de ligamiento de todos los genes).



**Ilustración 10: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRR1*.**

Tras la aplicación de la corrección de falsos positivos los principales resultados obtenidos fueron los siguientes:

Bajo un modelo recesivo de herencia, 8 haplotipos mantuvieron la significación en el gen *GABRR1*, todos ellos contienen los polimorfismos rs1331100-rs9204424-rs2183797-rs9353653 junto con una combinación de otros (rs1757815/rs13202074 – rs881293/rs2297389 y rs12200969/rs6902106) como se puede observar en la Tabla 15.

## Resultados

Marcadores	Haplotipo	Frec	p-valor
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	GAAGGCT	0,185	2,2·e <sup>-5</sup>
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	GAAGTCT	0,188	2,3·e <sup>-5</sup>
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	GAAGTCT	0,182	2,7·e <sup>-5</sup>
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	GAAGTCA	0,184	3·e <sup>-5</sup>
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	GAAGTCA	0,188	3,5·e <sup>-5</sup>
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	AAAGGCA	0,216	3,5·e <sup>-5</sup>
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	GAAGGCT	0,188	3,5·e <sup>-5</sup>
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	AAAGGCA	0,224	3,6·e <sup>-5</sup>

**Tabla 15: Resultados significativos *GABRR1* modelo recesivo.**

En el gen *GABRR2* sólo uno de los haplotipos mantiene la significación una vez aplicada la corrección de falsos positivos. Este haplotipo es el compuesto por los polimorfismos rs282129-rs282121-rs2148174-rs7744352, con un p-valor = 0,0014.

Aplicando un p-valor de 0,05 para la corrección de falsos positivos, dos haplotipos del gen *GABRB2* mantienen su significación en el modelo recesivo (rs1816071-rs7707429-rs17522737 con un p-valor = 0,019 y rs187269-rs7707429-rs17522737 con p-valor = 0,020) y un haplotipo del gen *GABRG1* en el modelo aditivo (rs13140445-rs1497559, p-valor = 0,017).

El análisis univariante de los SNPs de *GABRR1* realizado con FBAT dio como resultado significativo la asociación entre los SNPs rs393203, rsrs1331100, rs93962622 y rs2183797 y la migraña en el modelo dominante, si bien sólo rs1331100 y rs2183797 mantuvieron dicha significación tras corrección por FDR. En el caso del modelo recesivo los SNPs rs393203, rs1331100 y rs2183797 mostraron resultados significativos, significación que sólo se mantuvo en el caso de rs2183797; mientras que en el modelo aditivo sólo rs1331100 y rs93562622 mostraron significación nominal si bien, no se mantuvo en ninguno de estos polimorfismos tras la posterior corrección (Tabla 16).

Resultados

Marcador	Frec.	Modelo Recesivo			Modelo Dominante			Modelo Aditivo		
		Rango	P	P <sub>corr</sub>	Rango	P	R <sub>corr</sub>	Rango	P	P <sub>corr</sub>
rs393203	0,852/0,148	150	0,036	0,073	123	0,037	0,070	189,5	0,219	0,502
rs1331100	0,758/0,242	36	<b>0,003</b>	<b>0,010</b>	29	<b>0,002</b>	<b>0,010</b>	40,5	0,004	0,064
rs1757815	0,519/0,481	478	0,177	0,106	520,5	0,184	0,110	204	0,206	0,502
rs9362622	0,792/0,208	153	0,050	0,075	184	0,046	0,070	153,5	0,015	0,122
rs7742968	0,724/0,276	460	0,153	0,102	415	0,148	0,098	201,5	0,190	0,502
rs13202074	0,715/0,285	543	0,137	0,102	496,5	0,135	0,098	185	0,166	0,502
rs2183648	0,660/0,340	285,5	0,476	0,204	314,5	0,479	0,205	196,5	0,581	0,672
rs9294424	0,722/0,278	270	0,307	0,142	243	0,312	0,148	191	0,630	0,672
rs10944436	0,563/0,437	520,5	0,838	0,295	515	0,837	0,295	205,5	0,570	0,672
rs2150817	0,664/0,336	211,5	0,100	0,086	201	0,095	0,081	201,5	0,533	0,672
rs2183797	0,559/0,441	29	<b>0,002</b>	<b>0,010</b>	34	<b>0,003</b>	<b>0,010</b>	226,5	0,692	0,692
rs2297389	0,818/0,182	312	0,705	0,270	312,5	0,682	0,255	178	0,500	0,672
rs9444675	0,656/0,344	323	0,720	0,270	336	0,661	0,255	191	0,571	0,672
rs881293	0,727/0,273	149,5	0,076	0,086	141	0,087	0,081	223,5	0,610	0,672
rs9353653	0,659/0,341	404,5	0,307	0,142	533,5	0,320	0,148	197,5	0,402	0,672
rs6902106	0,788/0,212	343	0,265	0,142	373	0,264	0,144	899	0,899	0,847
rs12200969	0,662/0,338	591	0,097	0,086	516,5	0,095	0,081	231,5	0,179	0,502

Rango: representa el estadístico S observado obtenido con HBAT  
P: representa el p-valor obtenido con el estadístico HBAT para el análisis de un único marcador usando la opción -p  
P<sub>corr</sub>: es el resultado de corregir el p-valor crudo con el algoritmo de control FDR estratificado  
En negrita los resultados significativos

Tabla 16: Resultados del análisis univariante.

**Muestras casos y controles:**

Se genotiparon los SNPs significativos del estudio familiar en muestras de Cantabria, en una población gallega y otra cántabra de casos y controles.

Las muestras de origen cántabro (739 sujetos, 410 casos) y de origen gallego (712 sujetos, 367 casos) se seleccionaron en los respectivos centros. La muestra de Cantabria está compuesta por un exceso de MCA respecto a la gallega, y una menor proporción de controles ( $\chi^2$  17,22;  $p=0,0002$ ). La media edad de la muestra de Cantabria fue significativamente menor que la de Galicia. Las diferencias no fueron significativas entre migrañosos y controles cántabros, pero sí entre los dos subgrupos clínicos gallegos.

Origen	Controles	Casos
Cántabros	37,98±14,14	36,07±12,83
Gallegos	51,10±15,96	45,93±13,02

**Tabla 17: Media de edad de las muestras de casos y controles gallega y cántabra.**

Se realizó un análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los polimorfismos estudiados, en los controles de las dos poblaciones por separado, obteniéndose que el SNP rs881293 no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población gallega, por lo que fue eliminado de todos los análisis realizados posteriormente con las muestras de esta población; y en el caso de la población cántabra, todos los polimorfismos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que todos fueron empleados a la hora de llevar a cabo las distintas pruebas estadísticas.

El análisis  $\chi^2$  llevado a cabo en las dos poblaciones de casos y controles por separado y posteriormente tomadas en conjunto, muestra que existe una relación muy significativa entre el SNP rs9204424 en la población cántabra ( $p=0,003$ ), y en la muestra de las dos poblaciones tomadas en conjunto ( $p=0,005$ ), si bien el análisis de este mismo polimorfismo en la población gallega no llegaba a resultar significativo ( $p=0,065$ ), aunque sí mostró cierta tendencia. En el caso de la población cántabra, también se obtuvo una relación significativa entre el rs881293 y la migraña ( $p=0,029$ ). El resto de SNPs analizados en dichas poblaciones, y que aparecían con más frecuencia en los haplotipos significativos de la muestra de familias de la población de Cantabria, no dieron resultados significativos en ninguna de las poblaciones de casos y controles tomadas por separado, ni en el análisis de dichas poblaciones de gallegos y cántabros tomadas en conjunto (Tabla 18).

Resultados

SNP*	Genotipo	Muestra Cantabria					Muestra Galicia					Cant+Galic	
		Controles	Migrañosos	Total	$\chi^2$	p-valor	Controles	Migrañosos	Total	$\chi^2$	p-valor	$\chi^2$	p-valor
rs1331100	AA	203	202	405			154	174	328				
	AG	131	150	281			151	163	314				
	GG	18	30	48			36	30	66				
	Total	352	382	734	3,066	0,216	341	367	708	1,270	0,530	0,249	0,883
rs9204424	CC	123	103	226			134	166	300				
	CG	167	166	333			166	144	310				
	GG	63	105	168			39	49	88				
	Total	353	374	727	11,676	<b>0,003</b>	339	359	698	5,542	0,065	10,488	<b>0,005</b>
rs881293**	CC	32	34	66									
	CG	151	128	279									
	GG	168	217	385									
	Total	351	379	730	7,130	<b>0,029</b>							
rs93533653	CC	135	166	301			153	147	300				
	CT	150	153	303			146	169	315				
	TT	63	49	112			45	50	95				
	Total	348	368	716	4,417	0,113	344	366	710	1,382	0,501	1,289	0,525
rs6902106	AA	196	223	419			198	206	404				
	AC	127	135	262			120	128	248				
	CC	28	20	48			20	28	48				
	Total	351	378	729	2,321	0,313	338	362	700	0,928	0,629	0,170	0,901
rs12200969	CC	41	39	80			28	36	64				
	CT	160	170	330			148	159	307				
	TT	150	167	317			160	154	314				
	Total	351	376	727	0,405	0,816	336	349	685	1,263	0,532	0,111	0,946

\* El porcentaje de genotipado fue superior al 98,2% en todos los SNPs

\*\* El marcador rs881293 no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles genotipados en la población gallega, por lo que no se realizó ningún análisis con este polimorfismo en esta muestra poblacional.

Tabla 18: Resultados del análisis de las muestras de casos y controles en las poblaciones de Cantabria y Galicia.

## Resultados

Se realizó un subanálisis respecto a los dos subtipos de migraña: MCA y MSA. De nuevo el SNP rs9404424 mostró los mejores resultados asociativos respecto a los controles. La comparación entre MCA vs controles mostró una tendencia significativa ( $p=0,088$  para la MCA;  $0,099$  para la MSA) en la muestra de Cantabria. En la muestra de Galicia, rs9204424 resultó significativamente asociado con la MCA vs controles sanos ( $p=0,003$ ) (Tabla 19)

Marcador	Cántabros		Gallegos	
	MCAvsSANO	MSAvsSANO	MCAvsSANO	MSAvsSANO
rs1331100	0,3	0,099	0,4	0,7
rs9204424	0,088	0,099	0,003	0,7
rs881293	0,211	0,03	0,01	0,145
rs9353653	0,249	0,158	0,142	0,932
rs6902106	0,7	0,45	0,7	0,5
rs12200969	0,9	0,877	0,6	0,378

**Tabla 19: Resultados del Test Exacto de Fisher.**

La distribución alélica de los SNPs seleccionados en la muestra de réplica, analizada con el programa HAPSTAT, resultó significativamente diferente respecto a rs9204424 en la población de Cantabria (Tabla 20). El alelo G de rs9204424 se asoció con el fenotipo migraña incrementando el riesgo discretamente ( $OR = 1,42$ ;  $95\% IC = 1,16-1,75$ ;  $p=9,6 \cdot e^{-4}$ ). El alelo T tanto del marcador rs881293, como de rs9353653 parece que tendrían un pequeño efecto protector dentro de la población cántabra ( $OR = 0,79$ ;  $95\% IC = 0,63-0,99$ ;  $p=0,049$ ; y  $OR = 0,79$ ;  $95\% IC = 0,63-0,98$ ;  $p=0,034$ , respectivamente). Si bien hay que recordar, que en el caso del marcador rs881293 no puedo llevarse a cabo el análisis en la población gallega puesto que esta variante no está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Resultados

SNP	Alelo	Cántabros			Gallegos			Cántabros + Gallegos		
		Control	Migraña	OR	Control	Migraña	OR	Control	Migraña	OR
rs1331100	A	537	554	1,22 (ns)	459	511	0,90 (ns)	996	1065	1,04 (ns)
	G	167	210		223	223		390	433	
rs9204424	C	413	372	<b>1,42 (1,16-1,75; p=9,6e<sup>-4</sup>)</b>	434	476	0,90 (ns)	847	848	1,15 (0,99-1,34; p=0,06; ns)
	G	293	376		244	242		537	618	
rs881293	C	215	196	<b>0,79 (0,63-0,99; p=0,049)</b>	-	-	-	-	-	-
	T	487	562		-	-		-	-	
rs9353653	C	420	485	<b>0,79 (0,63-0,98; p=0,034)</b>	452	463	1,11 (ns)	872	948	0,93 (ns)
	T	276	251		236	269		512	520	
rs6902106	A	519	581	0,85 (ns)	516	540	1,10 (ns)	1035	1121	0,97 (ns)
	C	183	175		160	184		343	359	
rs12200969	C	242	248	0,94 (ns)	204	231	1,13 (ns)	446	479	1,03 (ns)
	T	460	504		468	467		928	971	

Tabla 20: Análisis genotípico de los marcadores de *GABRR1* en las muestras cántabra, gallega, y en conjunto.

## Resultados

La interacción entre marcadores se estudió mediante un análisis de regresión lineal empleando todas las posibles combinaciones de los polimorfismos genotipados. Las combinaciones de marcadores que dieron resultados significativos en la población cántabra de casos y controles (Tabla 21), compartían la presencia del marcador rs9204424, que ya había mostrado una significación positiva al ser analizado en esta misma población individualmente, lo que podría mostrar que existe alguna relación entre uno de los alelos de este polimorfismo y la migraña en la población cántabra. La mayor significación ( $p=0,002$ ), la encontramos en la combinación de los marcadores rs9204424 y rs881293 bien ellos dos solos o en combinación con rs1331100 y rs12200969, SNPs todos ellos situados en distintos bloques de desequilibrio de ligamiento, por lo que podría llevarnos a pensar la existencia de un haplotipo relacionado con la migraña en esta población.

Marcadores	F	p-valor
rs9204424-rs12200969	4,120	0,043
rs9204424-rs881293	10,148	0,002
rs9204424-rs9353653-rs12200969	4,151	0,042
rs9204424-rs9353653-rs881293	5,590	0,018
rs9204424-rs1331100-rs12200969-rs881293	9,490	0,002

**Tabla 21: Resultados significativos de las combinaciones de SNPs en la población cántabra de casos y controles.**

Cuando analizamos las distintas combinaciones de marcadores en la muestra poblacional de origen gallego (Tabla 22) observamos que no hay ningún SNP que se repita en todas las combinaciones como pasaba en el caso de la muestra cántabra. En este caso la combinación formada por rs9204424-rs1331100-rs9353653 y la constituida por rs1331100-rs9653653-rs12200969, presentan las mayores significaciones ( $p=0,006$ )

Marcadores	F	p-valor
rs9204424-rs1331100-rs9353653	7,715	0,006
rs9204424-rs6902106-rs12200969	4,063	0,044
rs1331100-rs9353653-rs12200969	7,606	0,006
rs9204424-rs1331100-rs9353653-rs6902106-rs12200969	4,986	0,026

**Tabla 22: Resultados significativos de las combinaciones de SNPs en la población gallega de casos y controles.**

Al tomar las dos poblaciones en conjunto (Tabla 23) vemos que sólo coincide el valor significativo de la combinación rs9204424-rs12200969 existente también en la población de Cantabria, destaca el hecho de que rs1331100-rs9353653 no aparece como significativa por

## Resultados

ella misma, cuando esta combinación de dos marcadores sí resulta significativa cuando se le añade uno o varios SNPs más.

Marcadores	F	p-valor
rs9204424-rs12200969	6,560	0,011
rs1331100-rs9353653-rs12200969	5,582	0,018
rs1331100-rs9353653-rs6902106	5,950	0,015
rs1331100-rs9353653-rs6902106-rs12200969	4,494	0,034

**Tabla 23: Resultados significativos de las combinaciones de SNPs en la muestra de casos y controles tomada en conjunto.**

En todas las combinaciones estudiadas tanto en la muestra de casos y controles cántabra, como en la gallega, como en la suma de ambas, se observa la presencia de los marcadores más frecuentes en la formación de los haplotipos más significativos encontrados en la muestra de base familiar cántabra, lo que nos lleva a pensar en la existencia de cierta relación entre estos marcadores y el fenotipo migraña. Si bien el hecho de seleccionar SNPs índice no permite concluir que sean los polimorfismos estudiados los que están asociados a la enfermedad, pudiendo ser otros que se encuentren en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento de los estudiados.

El análisis haplotípico llevado a cabo con el algoritmo HAPSTAT, introduciendo la posible interacción genotipo y origen de la muestra, en primer lugar. Los haplotipos contruidos con rs9204424 demostraron asociación significativa bajo diferentes modelos de herencia. Los resultados más significativos se obtuvieron bajo el modelo de herencia recesivo corregido por el equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto para la interacción gen-origen, como sin la corrección por equilibrio de Hardy-Weinberg ( $Z=4,724$ ,  $p < 0,0001$ ; y  $Z=2,81$ ,  $p=0,0049$ , respectivamente) para el haplotipo rs9404424-rs9353653-rs12200969.

Los datos de la Tabla 24 muestran los estadísticos de asociación bajo cada modelo (aditivo, recesivo y dominante), así como los efectos del origen de la muestra, del haplotipo y de la interacción del haplotipo con el origen, tanto corregidos por el equilibrio de Hardy-Weinberg, como no corregidos.

Resultados

	Haplotipo	Modelo Aditivo		Modelo Recesivo		Modelo Dominante	
	referencia	Z	p-valor	Z	p-valor	Z	p-valor
Origen	C	5,847	<b>&lt;0,0001</b>	3,874	<b>0,0001</b>	4,724	<b>&lt;0,0001</b>
m2		2,655	<b>0,007</b>	4,321	<b>&lt;0,0001</b>	0,6396	ns
origen*gen		-6,385	<b>&lt;0,0001</b>	-5,206	<b>&lt;0,0001</b>	-4,707	<b>&lt;0,0001</b>
Origen	A-C	2,222	<b>0,02</b>	1,206	ns	3,641	<b>0,0003</b>
m1-m2		-0,297	ns	-0,299	ns	0,286	ns
origen*gen		-1,51	ns	0,9452	ns	-3,4451	<b>0,0006</b>
No corregido		-1,39	ns	0,372	ns	-2,386	<b>0,017</b>
Origen	A-C-T	2,158	ns	0,25	ns	3,34	<b>0,0008</b>
m1-m2-m4		0,057	ns	-0,484	ns	0,612	ns
Origen*gen		-1,431	ns	1,75	ns	-3,289	<b>0,001</b>
No corregido		-0,9241	ns	0,877	ns	-1,875	ns
Origen	G-C-T	-2,136	<b>0,0327</b>	0,383	ns	-1,662	ns
m2-m4-m6		-2,885	<b>0,0039</b>	-1,542	ns	-3,6285	<b>0,0003</b>
origen*gen		6,074	<b>&lt;0,0001</b>	4,7244	<b>&lt;0,0001</b>	4,831	<b>&lt;0,0001</b>
No corregido		0,846	ns	2,811	0,0049	-0,977	ns
Origen	A-G-C-A	-1,448	ns	0,047	ns	-1,795	ns
m1-m2-m4-m5		-0,84	ns	0,664	ns	-1,67	ns
origen*gen		3,307	ns	0,587	ns	3,765	<b>0,0002</b>
Origen	A-C-T-T	0,194	ns	1,437	ns	0,072	ns
m1-m2-m4-m6		-1,418	ns	-0,5548	ns	-1,664	ns
origen*gen		2,923	<b>0,0035</b>	1,184	ns	2,964	<b>0,003</b>
No corregido		0,2482	ns	0,389	ns	0,084	ns

Siendo: m1=rs1331100; m2=rs9204424; m4=9353653; m5=rs6902106; m6=12200969.

**Tabla 24: Tabla de haplotipos con el rs9204424 según el algoritmo HAPSTAT.**

Si tomamos el alelo C del marcador rs9204424 por sí solo obtenemos significación positiva en todos los modelos analizados. El efecto del origen da valores de  $p$  en torno a 0,0001 en todos los modelos y el efecto de la interacción entre el origen y el alelo C resulta una significación de  $p < 0,0001$  tanto en el modelo aditivo, como en el dominante y el recesivo. El efecto del alelo C considerado independientemente es significativo en el modelo aditivo ( $p = 0,007$ ) y sobre todo en el modelo recesivo ( $p < 0,0001$ ).

## Resultados

El efecto del origen en el par constituido por rs1331100-rs9204424 resulta significativo tanto en el modelo aditivo ( $p=0,02$ ), como en el dominante ( $p=0,0003$ ). Modelo éste donde también es significativo el efecto de la interacción entre el origen y el haplotipo AC ( $p=0,0006$ ).

El haplotipo GCT formado por los marcadores rs9204424-rs9353653-rs12200969 presenta resultados significativos respecto al efecto del origen de la muestra, el haplotipo en sí mismo, así como la interacción entre haplotipo y origen, para el modelo aditivo ( $p=0,0039$ ;  $p=0,0327$ ;  $p<0,0001$ ); en el modelo recesivo sólo es significativa la relación entre el haplotipo y el origen ( $p<0,0001$ ), y en el modelo dominante el haplotipo ( $p=0,0003$ ) y la interacción entre haplotipo y origen ( $p<0,0001$ ).

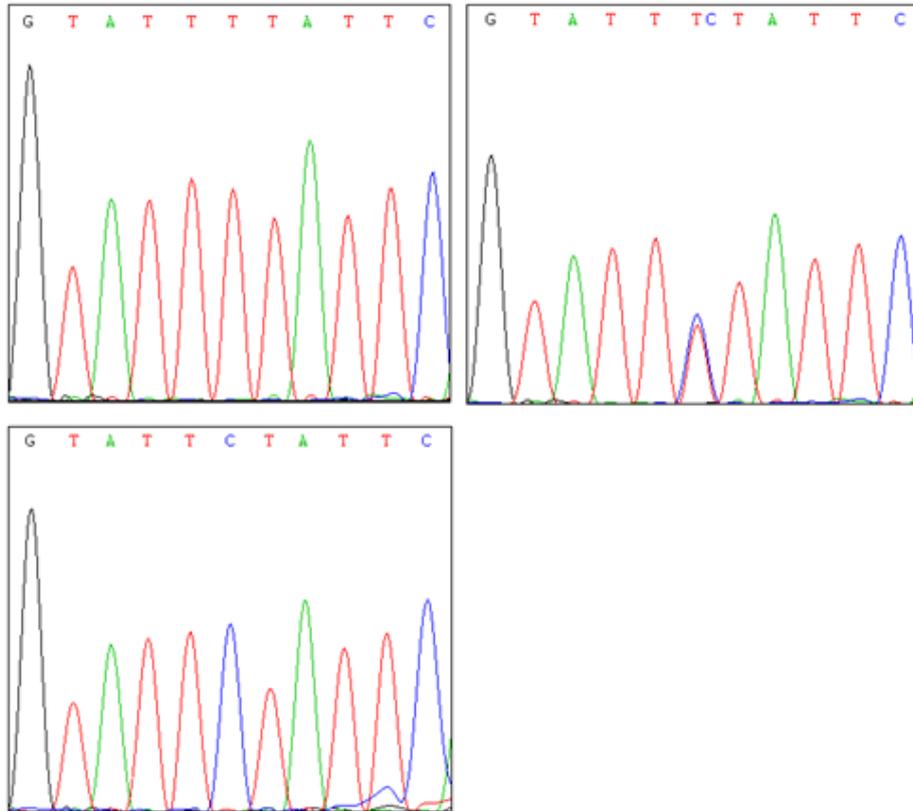
El modelo dominante es el que resulta significativo cuando estudiamos la combinación entre los marcadores rs1331100-rs9204424-rs9353653, sólo en el caso de la interacción entre el origen y el haplotipo ACT ( $p=0,001$ ) y al evaluar el efecto del origen ( $p=0,0008$ )

Cuando combinamos 4 marcadores como rs1331100-rs9204424-rs9353653-rs12200969 sólo obtuvimos resultados significativos en el caso de la interacción del origen con el haplotipo ACTT en el modelo aditivo ( $p=0,0035$ ) y en el dominante ( $p=0,003$ ). La combinación rs1221100-rs9204424-rs9353653-rs6902106 bajo el modelo dominante tiene un valor de  $p=0,0002$  sólo en el caso de la relación origen y haplotipo, no siendo significativas el resto de efectos.

En estos resultados se puede observar que cuantos más componentes formen el haplotipo mayor es la dispersión.

**Secuenciación:**

El análisis de la secuencia de 19 muestras de casos y controles de los exones y secuencias flanqueantes de los genes *GABRR1* y *GABRR2* permitió encontrar 20 polimorfismos en el gen *GABRR1* y 13 en el caso de *GABRR2*.



**Ilustración 11: Electroferogramas del rs371534431 donde se muestra el homocigoto TT (arriba izquierda), el homocigoto CC (abajo-izquierda) y el heterocigoto TC (arriba-dcha).**

## Resultados

Como se muestra en las Tabla 25 en el gen *GABRR1* se encontraron 5 polimorfismos en el extremo 5' y otros 5 son exónicos. Dentro de los polimorfismos exónicos, 3 son mutaciones sinónimas ya que no conllevan cambios en el aminoácido de la proteína, pero dos de ellos, rs12200969 y rs1186902, localizados en el exón 1 son mutaciones no sinónimas que predicen un cambio aminoacídico que, en el caso de rs12200969, el cambio de metionina por valina en el aminoácido 26 ambos aminoácidos son hidrofóbicos; en el rs1186902 los dos aminoácidos, tanto histidina como arginina son básicos, por ello con el programa Polyphen ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) se valoran como polimorfismos no patogénicos.

SNP	Posición	Nucleótido	maf	Aminoácidos
rs6905627	5'UTR	C/A	0,2628	
rs73501784	Intrón	G/A	0,1446	
rs914478	Intrón	A/G	0,3023	
rs10455503	5'UTR	C/T	0,3025	
rs9294425	5'UTR	C/T	0,3051	
rs34012805	5'UTR	A/-	0,3113	
rs386703619	5'UTR	A/G	-	
rs12200969	Exón 1	A/G	0,3061	Met26Val
rs1186902	Exón 1	A/G	0,2308	His27Arg
rs2297391	Intrón	G/T	0,0835	
rs75691355	Intrón	T/C	0,0102	
rs149384869	Intrón	T/C	0,0054	
rs1556432	Intrón	C/T	0,0525	
rs371534431	Intrón	T/C	0,0002	
rs79395763	Exón 2	G/A	0,0048	Leu55Leu
rs55999329	Intrón	C/T	0,0234	
rs422751	Exón 5	C/T	0,2061	Asp129Asp
rs407206	Intrón	C/T	0,1743	
rs3777539	Intrón	T/C	0,4006	
rs1796743	Exón 10	G/A	0,4561	Ala378Ala

**Tabla 25: Polimorfismos encontrados tras secuenciación del gen *GABRR1*.**

## Resultados

En la Tabla 26 se muestran los polimorfismos encontrados tras secuenciación de los exones y regiones flanqueantes del gen *GABRR2*. Sólo dos polimorfismos son exónicos, pero, en el caso de rs282117, no hay cambio de aminoácido, algo que sí sucede en el caso del rs272128, donde el cambio de Treonina por Metionina implica el paso de un aminoácido polar a uno no polar, aunque tras análisis del posible efecto de esta variación con el programa Polyphen tampoco se valora como patogénico.

SNP	Posición	Nucleótido	maf	Aminoácidos
rs41273313	Intrón	C/T	0,0956	
rs148860869	Intrón	C/T	0,0010	
rs6900958	Intrón	G/A	0,3079	
rs112180779	Intrón	G/A	0,0096	
rs3777516	Intrón	G/T	0,3075	
rs1570028	Intrón	C/T	0,3007	
rs2325202	Intrón	C/A	0,4229	
rs282117	Exón 3	A/G	0,3077	Val83Val
-	Intrón	T/A	-	
rs61372695	Intrón	C/T	0,0605	
rs58233945	Intrón	-/A	0,1306	
rs2273507	Intrón	C/G	0,2350	
rs282129	Exón 9	A/G	0,2522	Thr430Met

**Tabla 26: Polimorfismos de *GABRR2* encontrados tras secuenciación del gen.**

## **6.- DISCUSIÓN**

## Discusión

A pesar del desconocimiento existente sobre el mecanismo exacto que desencadena la migraña, hay un gran consenso en considerar que existen anomalías genéticas que condicionan hiperexcitabilidad en el sistema nervioso. Es por ello que el presente trabajo se ha propuesto estudiar la posible implicación del principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, el GABA, ya que además de encontrarse distribuido por todo el SNC y cuya función es vital, se conoce que los fármacos gabaérgicos modulan algunos eventos bioquímicos y fisiológicos implicados en la fisiopatología de la migraña.

Nuestros principales resultados demuestran que variantes del gen *GABRR1* están asociadas con migraña en general, lo que se sustenta en los resultados tanto del análisis genotípico como alélico en la población cántabra –familias y casos y controles- y con cierta tendencia en el análisis genotípico en gallegos. El marcador rs9204424 consistentemente se asocia a migraña, migraña con aura y forma parte de los haplotipos que se asocian con migraña en cada una de las submuestras analizadas. Por tanto, el segmento cromosómico correspondiente a rs1331100 y rs12200969 incrementa discretamente el riesgo de sufrir migraña. Dado que la migraña es de herencia compleja, hemos utilizado diversas aproximaciones metodológicas con objeto de investigar bajo modelos de herencia diferentes el efecto de las variantes alélicas analizadas. Así, en las familias migrañosas, el mejor resultado se obtuvo bajo el modelo recesivo, con altos niveles de significación corregidos por FDR. Ese mismo modelo fue aplicable también en el estudio haplotípico de las muestras de réplica, tanto por separado como en conjunto.

Por tanto, los resultados que hemos observado en la fase de descubrimiento en familias, se confirma de forma significativa en dos muestras de réplica diferente y en el conjunto de las mismas. Se precisan estudios funcionales de expresión en sistemas celulares apropiados, para determinar inequívocamente la participación de *GABRR1* en la migraña.

El análisis de las características de las muestras seleccionadas para el estudio de dos poblaciones del norte de España, con una frecuencia de pacientes migrañosos y características epidemiológicas similares, nos apunta ciertas diferencias en lo referente a la composición por subtipos de migraña, con un exceso de MCA en la muestra de Cantabria, y una media de edad superior en la muestra de Galicia. Los pacientes migrañosos fueron seleccionados por Neurólogos expertos en el campo de las Cefaleas, y se realizó entrevista clínica a todos los participantes para exclusión de otros tipos de cefalea o factores de confusión. Como se ha señalado previamente, la selección de los pacientes en las consultas de un hospital de tercer

nivel puede incurrir en sesgo de selección y explicar algunas de las diferencias observadas como el alto índice de MCA en ambas submuestras.

Aunque nuestro estudio de agregados génicos en los cromosomas 4,5 y 6 tampoco da una significación positiva en la mayoría de los genes estudiados; sin embargo, los resultados obtenidos con el programa Haploview parecen indicar cierta predisposición en el agrupamiento del cromosoma 4 implicando a los genes *GABRG1* y *GABRA2* que, al ajustar por corrección múltiple pierde la significación existente.

Por el contrario el estudio de haplotipos identificados usando el algoritmo FBAT sí muestra indicios de asociación en algunos genes, como por ejemplo *GABRG2* y *GABRA2*. Además, este programa avala la posibilidad de que en el agrupamiento del cromosoma 6 exista una variante causal de la enfermedad ya que encontramos relación significativa tanto en haplotipos del gen *GABRR1* como del *GABRR2*. Esta significación se mantiene tras la corrección de falsos positivos de manera que parece existir una conexión real entre los genes *GABRR1-2* y la migraña.

El uso de núcleos familiares nos ha permitido obtener una señal de asociación genética en regiones cromosómicas no asignadas previamente a migraña en ninguno de los estudios GWAS realizados hasta el momento, ni tampoco en los estudios de ligamiento con familias extensas. En el primer caso, la composición obligada de las muestras es multinacional, y como se demuestra en el primer GWAS de Anttilla et al<sup>183</sup>, en el que sólo se obtuvo una señal significativa con un solo marcador localizado en el cromosoma 8 tras el meta-análisis, ninguno en la fase de descubrimiento alcanzó la significación del GWAS. Esto es debido a varios factores intercurrentes que limitan la utilidad de tales ensayos en migraña. En primer lugar, la migraña es una enfermedad multifactorial, que no dispone hasta el momento, de un marcador bioquímico refrendado, a excepción del *CGRP*<sup>255,256</sup>. Las muestras de pacientes ven de este modo compuestas por patologías dolorosas similares a la migraña que restan valor a los datos asociativos. En segundo lugar, el origen poblacional tan diverso de los pacientes, que incluye nórdicos, centroeuropeos y europeos del sur, complica, aunque se corrija posteriormente por estratificación muestral, el análisis de asociación. Ejemplos de este efecto muestral lo tenemos en los resultados de los estudios de asociación de la *MTHFR*<sup>121,133,136</sup>, donde nuestros resultados se parecen más a los australianos y difieren de los encontrados en Finlandia. También, el origen de los controles humanos es ciertamente controvertido, mientras en algunos estudios como el presente, donde todos los controles han sido entrevistados por el mismo médico que estableció el diagnóstico de migraña, en los estudios GWAS se sabe que

## Discusión

han sido incluidos a través de cuestionarios sin supervisión por neurólogo alguno. Por último, la variabilidad genética que se consigue capturar en los GWAS, es más limitada por el efecto de dispersión genética que los estudios de base familiar, y fundamentados en desequilibrio de transmisión de alelos. Cuanta más variabilidad genética se analiza, los tamaños muestrales crecen exponencialmente. Así uno de estos GWAS<sup>257</sup> se ha realizado en una población de especial interés genético, en la Isla Norfolk, situada al este de Australia. Esta isla es singular, ya que alberga a una población que originalmente fue poblada por 17 personas. Los descendientes de aquellos pobladores, los Bounty, muestran una de las tasas de migraña más elevadas (doble que en la población caucásica australiana). En este estudio se halló asociación significativa con el gen *ZNF555* (rs4807347,  $p=0,6 \cdot e^{-6}$ ), replicado significativamente en otra población con más de 500 migrañosos; lo que supone un tamaño muestral realmente reducido en comparación con los requeridos en los GWAS. Además, al utilizar un planteamiento de prioridad biológica, cuatro SNPs del gen *ADARB2* (involucrado en la edición del ARN de los receptores glutamatérgicos), dos del gen *GRM7* (gen que codifica el receptor metabotrópico de glutamato 7), y otros dos del *HTR7* (receptor de serotonina), mostraron asociación con migraña en esta misma población Bounty. Todos estos hallazgos sugieren que existe una alteración de la neurotransmisión serotoninérgica y glutamatérgica que puede ser específica de la población Bounty, ya que esos SNPs no se habían asociado en caucásicos en ninguno de los estudios tipo GWAS anteriores. La relevancia de este trabajo radica en la selección de la población a estudio, piedra angular de los estudios de asociación genética.

Los marcadores informativos seleccionados han sido polimorfismos intrónicos en su mayoría, por lo tanto estos cambios no se ven reflejados en la proteína funcional, salvo en el caso del rs12200969 (cambio en un exón Met26Val). Sin embargo, estos polimorfismos sí que pueden dar pistas de que la relación entre otro SNP exónico, situado en su mismo bloque de desequilibrio de ligamiento, que sea el que en realidad tenga la relación con la migraña, o intrónico y que altere el ensamblaje exónico durante la maduración del ARN.

Los distintos estudios llevados a cabo en los genes de las distintas subunidades de los receptores GABA ionotrópicos no han servido para asegurar el papel del GABA en la migraña, si bien los estudios en el cromosoma 15 han mostrado cierta evidencia de un locus de susceptibilidad para MCA en la región 15q11-q13, donde se localizan los genes *GABRB3*, *GABRG3* y *GABRA5*<sup>155</sup>. Este estudio llevado a cabo en 5 familias que segregan para MCA en al menos 3 generaciones, y del que formaron parte 47 individuos (26 de ellos afectados) mostró un LOD score máximo de 5,56 para la fracción de recombinación 0,001 en el gen *GABRB3*, apoyado por análisis multipunto que obtuvo un LOD score máximo de 6,54 entre los

marcadores D15S113 y D15S1019. El posterior análisis en 10 familias concluyó con la relación entre el polimorfismo C75T del gen *GABRB3*, presente en todos los individuos afectados de una de las familias, con la MCA. Estudios posteriores de tipo caso-control en numerosos polimorfismos de dicha región del cromosoma 15 dieron resultados positivos, que en posteriores replicaciones en poblaciones de tamaño muestral superior no han podido ser replicados<sup>113,114</sup>. La réplica de alguno de esos SNPs en nuestra muestra poblacional, al igual que en otros trabajos descritos, tampoco dio resultados positivos. También se encontró una región que asociaba la migraña con los receptores GABA en el cromosoma X, concretamente Xq24-28 donde se localizan los genes *GABRE*, *GABRA3* y *GABRQ*<sup>113,141</sup>. En un principio, los estudios de polimorfismos en una muestra australiana de casos y controles no obtuvieron resultados positivos ni en *GABRE*, ni en *GABRQ*<sup>112</sup>. El estudio llevado a cabo con nuestra muestra poblacional en esta agrupación del cromosoma X tampoco obtuvo resultados positivos<sup>258</sup>, si bien años más tarde, Quintas et al<sup>259</sup>, ampliando el número de SNPs genotipados, consiguió resultados positivos tanto en un polimorfismo de los estudiados en el anterior trabajo (rs3810651) como en polimorfismos de *GABRA3* (rs213190 y rs3902802), gen que no había sido incluido en el estudio en el caso del trabajo australiano. Sin embargo, lo más interesante de este trabajo, realizado en migrañosos portugueses, es la observación de interacción gen-gen dependiente del sexo entre 6 de los SNPs estudiados.

En el cromosoma 5 se ha investigado el papel de un SNP (rs211037), en el gen *GABRG2* en una muestra de casos y controles sin encontrar diferencias alélicas significativas ni separando por fenotipo MCA vs MSA, ni con la migraña en conjunto<sup>260</sup>. El resto de genes de los receptores GABA de los cromosomas 4, 5 y 6 no han sido estudiados en migraña hasta este momento.

En el estudio de base familiar encontramos cierta relación entre la agrupación de genes del cromosoma 6 y el fenotipo de migraña. Por ello se llevó a cabo la secuenciación de todos los exones de los genes *GABRR1* y *GABRR2*, con el fin de comprobar si existe alguna mutación en sus secuencias, que varíen la proteína que forma el receptor GABA, y que impida que éste realice correctamente su función y favorezca así la excitación anormal que caracteriza a la migraña.

A pesar de haber encontrado un total de 20 polimorfismos en *GABRR1* y 13 en *GABRR2*, sólo 3 de ellos provocaban un cambio de aminoácido en la proteína (rs12200969-Met26Val, rs1186902-His27Arg y rs282129-Thr430Met), si bien el programa Polyphen los considera como una modificación no patogénica, por lo que no es posible asegurar que exista

una relación inequívoca entre ninguno de estos polimorfismos y la migraña. De hecho, estos tres polimorfismos son muy frecuentes en la población, con un índice de heterocigosidad superior al 0,3 y la frecuencia de alelo menos común es mayor a 0,2.

En la revisión exhaustiva de la literatura son escasos los estudios con los polimorfismos rs12200969, rs1186902 o rs282129 correspondientes a *GABRR1* y *GABRR2*. Estos marcadores han sido estudiados en otras patologías como el temblor esencial, basándose en que algunos fármacos gabaérgicos han dado resultados positivos en pacientes con este trastorno. El estudio de los genes de las subunidades *GABRR*, y más concretamente de los SNPs no conservativos, en una población española con temblor esencial, en cambio, no dio ningún resultado positivo<sup>261</sup>.

No ocurrió lo mismo en el estudio de *GABRR1* y *GABRR2* en relación con la dependencia alcohólica en familias americanas, donde se obtuvieron varios haplotipos con un denominador común, la presencia en todos ellos de rs282129. De estos haplotipos se concluía una cierta tendencia a la sobreexpresión del nucleótido que codifica el aminoácido metionina en los individuos afectados, además de que este polimorfismo era más frecuente en los pacientes con un inicio más temprano de la dependencia al alcohol<sup>262</sup>.

La expresión de los genes *GABRR1* y *GABRR2* se ha demostrado que está íntimamente ligada. Los receptores que presentan estas subunidades suelen ser homoméricos y en caso de ser heteroméricos, lo más frecuente es que estén formados por combinaciones de  $\rho_1$ - $\rho_2$ , sin unirse a otro tipo de subunidades, llegando incluso a ocurrir que en caso de delección de la subunidad  $\rho_1$  sea  $\rho_2$  la que supla su función, como se demostró en ratones sobre los que se quería observar la relación existente entre la subunidad  $\rho_1$  y la respuesta al alcohol, demostrándose además que la respuesta de estos ratones al etanol no era la misma que cuando los receptores GABA ionotrópicos estaban formados por subunidades distintas de  $\rho_1$  y  $\rho_2$ <sup>263</sup>.

Se conoce que estos genes que codifican para las subunidades  $\rho_1$  y  $\rho_2$  se expresan principalmente en la retina donde forman agregados<sup>264</sup>, y ha sido ampliamente estudiada su participación en el sistema visual<sup>265</sup>; pero también se expresan en distintas áreas del sistema nervioso central como son el colículo superior<sup>266</sup>, cerebelo<sup>267</sup>, hipocampo<sup>268</sup>, pituitaria y la amígdala lateral<sup>269</sup>. Todas estas localizaciones los han relacionado con el proceso del sueño-vigilia, el desarrollo de la miopía<sup>270</sup>, mejora de la memoria<sup>271</sup>, trastorno de ansiedad, dependencia de drogas y fármacos<sup>272</sup>. Sin embargo, cabe destacar la presencia de expresión de los genes *GABRR1* y *GABRR2* en la médula espinal y el asta dorsal de mamíferos<sup>273</sup>, cuya

## Discusión

expresión implica una relación entre estas subunidades y la vía de transmisión del dolor. El estudio en ratones que no expresaban *GABRR1* mostraba la alteración de la sensibilidad al dolor mecánico, así como descenso en el umbral de este tipo de dolor, incluso con la sensibilidad aumentada, lo que sustenta el papel antinociceptivo de los receptores *GABRR1* y *GABRR2*<sup>274</sup>. El estudio de estos efectos anti-nociceptivos de los receptores GABA ionotrópicos formados por las subunidades  $\rho$ , ha permitido encontrar un posible papel de estos receptores en el alivio del dolor, y su expresión en asta dorsal espinal, especialmente en la sustancia gelatinosa, implicada en la modulación del dolor<sup>275</sup>.

Todos los estudios que obtienen resultados significativos al relacionar la migraña con alguno de los genes que codifican las diferentes subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub>, se han realizado con una muestra de base familiar, lo mismo que sucede en nuestro trabajo; si bien el nuestros resultados se corroboran en la réplica con dos poblaciones de casos y controles totalmente independientes.

Nuestra investigación muestra una serie de variantes en la secuencia de los genes que codifican para las subunidades  $\rho$  de los receptores GABA ionotrópicos que, si bien tras la aplicación de algoritmos informáticos descartan su patogéneidad teórica no será hasta la realización de ensayos funcionales con estas variantes cuando podamos dar pruebas sólidas de la existencia o no de relación entre los polimorfismos encontrados y la migraña.

## **FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL TRABAJO.**

### **Fortalezas:**

El presente trabajo ha sido diseñado con un tamaño muestral adecuado tanto para las submuestras de familias como de controles. El empleo de núcleos familiares de la misma región evita en parte la estratificación muestral, dado que los miembros de una misma familia habitan en el mismo ambiente, lo que evita adicionalmente posibles sesgos por interacción con factores ambientales. En todos los casos, el diagnóstico de migraña se ha establecido por expertos clínicos; las determinaciones genéticas se han comprobado usando controles de calidad de los distintos experimentos de genotipado. Los test estadísticos han sido corregidos por el error Beta y se han empleado diferentes aproximaciones con resultados similares.

### **Limitaciones:**

Las muestras han sido seleccionadas en centros especializados en migraña, lo que supone un sesgo de selección inevitable. La composición de nuestros subgrupos clínicos de casos y controles no están perfectamente ajustados por edad y sexo; y, especialmente, la muestra de Galicia es ligeramente más vieja que la de Cantabria, y la composición de ambas respecto a los subtipos de migraña, también difieren.

## **7.- CONCLUSIONES**

## Conclusiones

1. Hay variantes de susceptibilidad de la migraña en el brazo largo del cromosoma 6 (locus 6q13-q16), donde se localizan los genes *GABRR1* y *GABRR2*.
2. El rs9204424 es el que resulta más consistentemente asociado con el fenotipo migraña, pero también con el fenotipo MCA en el subgrupo de Galicia.
3. El haplotipo extendido rs1331100 - (rs175815/rs13202074) - rs9204424 - rs2183797 - (rs881293/rs2297389) - rs9353653 - (rs12200969/rs6902106) del gen *GABRR1* está asociado con la migraña.
4. El haplotipo rs282129 – rs282121 – rs2148174 – rs7744352 del gen *GABRR2* está asociado con el fenotipo migraña en general.
5. Encontramos haplotipos en los genes *GABRG1* y *GABRB2* con asociación nominal, pero que no soportan corrección por análisis múltiple.
6. La secuenciación de los exones del gen *GABRR1* permitió encontrar 5 mutaciones, si bien sólo dos de ellas (rs12200969 y rs1186902) provocan el cambio de aminoácido en la proteína.
7. La secuenciación de los exones del gen *GABRR2* permitió encontrar 2 mutaciones, de las que únicamente la denominada rs282129 implica un cambio en la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\rho_2$  del receptor GABA.
8. De los SNPs más significativos y pertenecientes a los distintos bloques de desequilibrio de ligamiento, se obtuvo asociación significativa en las muestras de réplica en el caso de rs9244024 en la población cántabra, con una tendencia a la significación en la muestra gallega.
9. El análisis haplotípico confirmó en ambas muestras, cántabra y gallega, que los haplotipos construidos con rs9244024 se asociaron con migraña, confirmando las observaciones establecidas en la fase de descubrimiento con las familias de migraña.

## **8.- ANEXOS**

## **ANEXO I: CONSENTIMIENTO INFORMADO**

## HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Lea la siguiente información con detenimiento para estar seguro/a que comprende perfectamente el objetivo de esta donación y el estudio que se realizará, y firme en caso de que esté de acuerdo de hacer una donación o participar en el estudio que lleva por título, “Estudio de asociación génica de la migraña con los genes que codifican el receptor GABA1A en la población cántabra en general”.

De manera resumida, el presente proyecto pretende conocer las posibles bases genéticas que pueden influir en el desarrollo de la migraña.

No recibirá ningún beneficio directo por el hecho de participar en el estudio, ya que los resultados únicamente tendrán un interés científico. No obstante, en el caso que los datos pudieran proporcionarle un potencial beneficio con respecto a la enfermedad, le serán comunicados siempre que con anterioridad, no hubiera manifestado por escrito el deseo de no recibir este tipo de información. Para realizar este estudio se necesitarán muestras de sangre, que se utilizarán para obtener el material genético, que servirá para los diferentes análisis.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. No habrá ninguna consecuencia negativa para usted en caso de no aceptar la participación. En cualquier momento, puede solicitar sus datos personales, que constan en el estudio, por si hace falta rectificar alguno; así como revocar esta autorización sin dar explicaciones y sin que ello repercuta en sus cuidados médicos. En ese caso tiene que realizar una comunicación escrita dirigida al Dr. Agustín Oterino (cefaleascantabria@hotmail.com). Su petición será atendida de forma inmediata y se destruirán las muestras de sangre que facilitó.

Se garantiza la confidencialidad, eso quiere decir que siempre se guardará el anonimato de los datos. Por eso los resultados del estudio se almacenarán en archivos específicos creados especialmente para este fin, y estarán protegidos con las medidas de seguridad exigidas en la legislación vigente. Estos datos no se incluirán en su historia clínica. Los resultados obtenidos podrán ser consultados por los investigadores del estudio, y ser publicados en revistas científicas sin que consten los datos personales de los donantes. Para preguntas o comentarios puede comunicarse por correo electrónico en: cefaleascantabria@hotmail.com. Con la firma de esta hoja de consentimiento, da su permiso para la utilización de las muestras de sangre en este estudio de investigación.

Anexo I: Consentimiento informado

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE**

Título del estudio: "Estudio de asociación génica de la migraña con los genes que codifican el receptor GABA1A en la población cántabra en general"

Yo, \_\_\_\_\_  
(nombre y apellidos del paciente o representante legal)

He leído las hojas de información al paciente.

He podido hacer suficientes preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con \_\_\_\_\_ (nombre del investigador) y

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1.- Cuando quiera.
- 2.- Sin tener que dar explicaciones.
- 3.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Santander a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20

Firma del participante

Firma del médico que informa

Nombre y firma del representante legal

## Anexo I: Consentimiento informado

### REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

En el caso de que quiera revocar su consentimiento y no seguir participando en el mismo, sólo tiene que firmar este apartado. Sus muestras se destruirán, y los datos que se hubieran recogido serán eliminados de las bases de datos.

La revocación del consentimiento no modificará el trato con usted, ni la forma en la que por la *lex artis* se debe tratar su enfermedad.

Yo, \_\_\_\_\_  
(nombre y apellidos del paciente o representante legal)

Revoco mi consentimiento para el proyecto: "Estudio de asociación génica de la migraña con los genes que codifican el receptor GABA1A en la población cántabra en general"

Santander a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20

Firma del participante

Firma del médico

Nombre y firma del representante legal

## **ANEXO II: PRIMERS PARA SECUENCIACIÓN**

Anexo II: Primers para secuenciación

Nombre	Primer F	Primer R	pb	Exón
GABRR1 1-2	CCCACATGTGCAAAGCAAGACCAA	TGAACCCGGTACCTCAGATGGAAATGCAGAAA	282	1
GABRR1 3-4	GCATATAACCTACACACATTCTCCTG	ATCAGCTGTTTCCACGTGCT	204	2
GABRR1 5-6	AGGGCTGACTGTGGCTAGAAA	AGGGACCAGGCAATGCTTAACT	180	2
GABRR1 7-8	AATCCAGCCCTCAGCTAAAGCA	TGAATTCCTGTGTCCCAGTGGA	212	3
GABRR1 9-10	TCTGGCCTTACTCCTCTTGGA	ACAGCCAACATGGGTTTCCA	350	3
GABRR1 11-12	TCCAGATTGCATCCTGTGGGTT	TGTCCACTCACCTGCCTTTCTT	237	3
GABRR1 13-14	TTGGCCACTGAAAGCAGAATGC	AGCAGCAGGAGAACAAGGGAA	171	3
GABRR1 15-16	AGCCGGTTTCTGCTTCCTTGTA	TGATGCAGGATGACATGAGACAGC	299	4
GABRR1 17-18	TGCAGAATGGCAGAGGTTCTT	ATCCCTGTGGACCCTCAATACCTA	356	5
GABRR1 19-20	TTGAAGCAAATCTGGAGGGAGAGG	ACAGTTGAGGTTACGGAGGAA	155	6
GABRR1 21-22	ATGATCAGCCTGGTTTCTTCCC	TGGCTAATTTCTGCCACA	165	7
GABRR1 23-24	TCTGATATGACATTGAGGTTCCAGGG	GGACCGGCTTTGTGAATCCC	181	8
GABRR1 25-26	CCACATCTCAGTGGGTTTGTGTGT	TGTCGTGGATGAAGGAGCGTTT	175	9
GABRR1 27-28	AAGCACCAACAACCTCAGCA	CCTTGATGTTGAGAAGCTGGCA	251	9
GABRR1 29-30	CATATTGGAAGGAAGCAGAGGC	TATCAGGAGCTGTGTGCTGA	178	10
GABRR1 31-32	TTGCCACCACCTTGTGTCTGAT	TGCTACCTGACGACCAATTCA	241	11
GABRR1 33-34	AGGAGCCATGATGTGTACTGTC	GCAGATGCTTGGAAATATGCACT	189	12
GABRR1 35-36	ATGTGTAGGTGTTTGTGCTGGGCA	AGATGTCCACGGCCTTGATGT	193	13
GABRR1 37-38	ATCACAACGGTGCTGACCATGT	ACCTGGTCCAAGTATGTGGTAGGT	392	13
GABRR1 39-40	AGGGCTTCTGAGAGATGATGCTGA	ATCAATGGCGTGGGTGTCGATT	233	14
GABRR1 41-42	AAGCCCGACAGGATGATGGT	TGGGTGGGTCCTGGGATTT	258	14
GABRR1 43-44	TCCATGGCATGCACTACAGA	AAATGTGCCACAACACTGG	240	14
GABRR1 45-46	AGGTGCTGCAGGAAATACGACA	ATGCAAATGGCCTGTAGGTGCT	161	14
GABRR1 47-48	TTCACCCGTTAGACCCTTGAT	AGCAATTGCGCCAATCTAAAGAGC	269	14
GABRR1 49-50	GCTGTGGTTCACAGGCTTTA	TCTCTACCCAAGTTCCTCAGTG	247	14
GABRR1 51-52	TCTTGGAGCATGTCCTTGTTC	TGGTCTAGGTGATGGCAGTT	241	14
GABRR1 53-54	GGGAAGATATCACTGGACATCTGCAT	GCTGTTTGGGTAAGTTTGGTGGAG	191	14

Tabla 27: Listado de primers para la secuenciación de exones de *GABRR1*.

Anexo II: Primers para secuenciación

Nombre	Primer F	Primer R	pb	Exón
GABRR2 1-2	GCAAAGCCTGGTGTGTTGTGT	TGACTTTACCTTGGCTTGGGCA	300	1
GABRR2 3-4	ATTTGCTCTGCCACAGGCTA	AAGGAAGGCTCATCCCAGTCTA	345	1
GABRR2 5-6	ACGGGTGTAAACACTGCAGGA	TCACGGACATGTTCCAGCACAA	321	2
GABRR2 7-8	TCGGACACCAGGTCATTCATGT	ATGCTGTCCATCCAGAGCAAGA	229	2
GABRR2 9-10	TGTTGCTGATGAGGGTGGAA	TGCACAAGCTGGTGGTGAACAT	311	2
GABRR2 11-12	GCAGCCATCATGTTCTTGGCAT	GCATCATGAACACCTTCAGCGT	363	2
GABRR2 13-14	TTGTAGGGCTCCACCACAGTGA	TGGTGGATTCCCTCCTGGATGT	166	2
GABRR2 15-16	GGGATACTCCTCATGCATCTTGCT	ACTTGGAGCTGGAGCAGATCA	309	2
GABRR2 17-18	AATGGCCCGAGGCACATACTTA	ACAGCTAACCAGGGAGGTGAAA	277	2
GABRR2 19-20	TGCATTGAAGAGCCGATGGA	AGGGACTCAGGAAATGGAGTCA	257	3
GABRR2 21-22	AAGGTGCCTTAACCAGCTGTCTCT	TTTATCACCTCCAGCTCCCGCT	163	4
GABRR2 23-24	TTTCCAACCTGCACAGTGCCATC	TGTTGTCAGTGGTGGTGTCA	299	5
GABRR2 25-26	TTTCTCCAGCGCCAGCAACAA	AAGGCACTGGACAGAGGAACAA	168	5
GABRR2 27-28	TTGTGTGCTGTGCCTTCTTGCT	TCGCTTCTGATGCAGGGTGAAGTA	281	6
GABRR2 29-30	TGCATCAGAAGCGAAGGAGTCA	TTGGGAGACAGAGTGAGACCTTGT	283	7
GABRR2 31-32	TCCCAGGGACACAGTTTGCTTT	AGGAAACTGAGGCCAGCATCTA	347	8
GABRR2 33-34	TGGAAACACACCTGGGACTT	ACGAACACAAAGCTGACCCA	199	9
GABRR2 35-36	TGCTGACCATGACCACCATCAT	TTCACCCAGCAGCATGGACTTA	189	9
GABRR2 37-38	TGTTCTTTGTGCTTGCTGCCCA	TTCTTTCTGGCAGCGTTGGCTT	163	10
GABRR2 39-40	AAGCTACAGTGAGTCTGAGGCCAA	TGCCCTCTTCTAGGAACAGCCTT	245	10
GABRR2 41-42	AGGTTGATATTCCCTGCCTCCT	AGAGATGTGAAGTGTGACGCGA	251	10

Tabla 28: Listado de primers para la secuenciación de exones de *GABRR2*.

## **ANEXO III: TABLAS DE RESULTADOS**

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs4596421 - rs4921199	0,031855	1	0,0025	0
rs4596421 - rs12187575	0,279244	2	0,005	0
rs4428455 - rs4921199	0,801653	3	0,0075	0
rs4428455 - rs12187575	0,869888	4	0,01	0

Tabla 29: Resultados *GABRA1* modelo aditivo.

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs4596421 - rs4921199	0,032052	1	0,0025	0
rs4596421 - rs12187575	0,148927	2	0,005	0
rs4428455 - rs4921199	0,324232	3	0,0075	0
rs4428455 - rs12187575	0,923382	4	0,01	0

Tabla 30: Resultados *GABRA1* modelo dominante.

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs4596421 - rs4921199	0,304996	1	0,0025	0
rs4596421 - rs12187575	0,532353	2	0,005	0
rs4428455 - rs4921199	0,540254	3	0,0075	0
rs4428455 - rs12187575	0,548052	4	0,01	0

Tabla 31: Resultados *GABRA1* modelo recesivo.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs12647055 - rs1442060 - rs1372472	0,067213	1	0,0005	0
rs279864 - rs1442060 - rs1372472	0,088393	2	0,001	0
rs12647055 - rs9291283 - rs1372472	0,105713	3	0,0015	0
rs279862 - rs9291283 - rs1372472	0,12939	4	0,002	0
rs279862 - rs1442060 - rs1372472	0,167369	5	0,0025	0
rs279864 - rs9291283 - rs1372472	0,172177	6	0,003	0
rs279862 - rs3849591 - rs1372472	0,198983	7	0,0035	0
rs12647055 - rs3849591 - rs1372472	0,21664	8	0,004	0
rs279864 - rs6856130 - rs1372472	0,332759	9	0,0045	0
rs3822051 - rs6856130 - rs1372472	0,34905	10	0,005	0
rs3822051 - rs9291283 - rs1372472	0,379112	11	0,0055	0
rs3822051 - rs1442060 - rs1372472	0,393788	12	0,006	0
rs279864 - rs16859354 - rs1372472	0,425879	13	0,0065	0
rs279864 - rs3849591 - rs1372472	0,468842	14	0,007	0
rs3822051 - rs16859354 - rs1372472	0,471244	15	0,0075	0
rs279862 - rs16859354 - rs1372472	0,509518	16	0,008	0
rs3822051 - rs3849591 - rs1372472	0,530281	17	0,0085	0
rs12647055 - rs6856130 - rs1372472	0,578804	18	0,009	0
rs279862 - rs6856130 - rs1372472	0,593298	19	0,0095	0
rs12647055 - rs16859354 - rs1372472	0,594911	20	0,01	0

Tabla 32: Resultados *GABRA2* modelo aditivo.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs279864 - rs1442060 - rs1372472	0,010951	1	0,0005	0
rs12647055 - rs1442060 - rs1372472	0,065411	2	0,001	0
rs279862 - rs1442060 - rs1372472	0,091221	3	0,0015	0
rs12647055 - rs9291283 - rs1372472	0,150519	4	0,002	0
rs279862 - rs9291283 - rs1372472	0,203456	5	0,0025	0
rs279862 - rs3849591 - rs1372472	0,204656	6	0,003	0
rs3822051 - rs9291283 - rs1372472	0,209272	7	0,0035	0
rs12647055 - rs3849591 - rs1372472	0,22354	8	0,004	0
rs279864 - rs3849591 - rs1372472	0,23448	9	0,0045	0
rs3822051 - rs6856130 - rs1372472	0,259605	10	0,005	0
rs279864 - rs9291283 - rs1372472	0,270488	11	0,0055	0
rs3822051 - rs1442060 - rs1372472	0,281697	12	0,006	0
rs279864 - rs6856130 - rs1372472	0,304751	13	0,0065	0
rs3822051 - rs16859354 - rs1372472	0,373249	14	0,007	0
rs279864 - rs16859354 - rs1372472	0,399337	15	0,0075	0
rs3822051 - rs3849591 - rs1372472	0,44777	16	0,008	0
rs279862 - rs16859354 - rs1372472	0,506073	17	0,0085	0
rs12647055 - rs6856130 - rs1372472	0,563457	18	0,009	0
rs279862 - rs6856130 - rs1372472	0,623214	19	0,0095	0
rs12647055 - rs16859354 - rs1372472	0,73048	20	0,01	0

**Tabla 33: Resultados GABRA2 modelo dominante.**

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs12647055 - rs3849591 - rs1372472	0,255376	1	0,0005	0
rs279862 - rs3849591 - rs1372472	0,305108	2	0,001	0
rs3822051 - rs9291283 - rs1372472	0,307932	3	0,0015	0
rs279864 - rs9291283 - rs1372472	0,611153	4	0,002	0
rs279862 - rs1442060 - rs1372472	0,625907	5	0,0025	0
rs279862 - rs9291283 - rs1372472	0,643023	6	0,003	0
rs279864 - rs16859354 - rs1372472	0,687171	7	0,0035	0
rs279862 - rs16859354 - rs1372472	0,705312	8	0,004	0
rs279864 - rs1442060 - rs1372472	0,758814	9	0,0045	0
rs12647055 - rs16859354 - rs1372472	0,759463	10	0,005	0
rs3822051 - rs16859354 - rs1372472	0,761665	11	0,0055	0
rs12647055 - rs9291283 - rs1372472	0,770253	12	0,006	0
rs3822051 - rs1442060 - rs1372472	0,788991	13	0,0065	0
rs12647055 - rs1442060 - rs1372472	0,825988	14	0,007	0
rs3822051 - rs3849591 - rs1372472	0,837786	15	0,0075	0
rs279862 - rs6856130 - rs1372472	0,871462	16	0,008	0
rs279864 - rs3849591 - rs1372472	0,882813	17	0,0085	0
rs3822051 - rs6856130 - rs1372472	0,904393	18	0,009	0
rs279864 - rs6856130 - rs1372472	0,923615	19	0,0095	0
rs12647055 - rs6856130 - rs1372472	0,998359	20	0,01	0

Tabla 34: Resultados *GABRA2* modelo recesivo.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,208967	1	0,00033333	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,294572	2	0,00066667	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,302839	3	0,001	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,43199	4	0,00133333	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,461591	5	0,00166667	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,485653	6	0,002	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,538846	7	0,00233333	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,550548	8	0,00266667	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,565	9	0,003	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,600349	10	0,00333333	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,604069	11	0,00366667	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,610419	12	0,004	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,630886	13	0,00433333	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,651807	14	0,00466667	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,663557	15	0,005	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,699088	16	0,00533333	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,748667	17	0,00566667	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,751152	18	0,006	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,780564	19	0,00633333	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,786238	20	0,00666667	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,786298	21	0,007	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,789285	22	0,00733333	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,807734	23	0,00766667	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,826282	24	0,008	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,848739	25	0,00833333	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,867532	26	0,00866667	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,876969	27	0,009	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,881586	28	0,00933333	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,908991	29	0,00966667	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,926778	30	0,01	0

Tabla 35: Resultados *GABRA4* modelo aditivo.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,407588	1	0,00033333	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,430848	2	0,00066667	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,471313	3	0,001	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,488339	4	0,00133333	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,51988	5	0,00166667	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,552995	6	0,002	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,566034	7	0,00233333	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,591544	8	0,00266667	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,601874	9	0,003	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,602026	10	0,00333333	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,608782	11	0,00366667	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,614243	12	0,004	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,617324	13	0,00433333	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,64506	14	0,00466667	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,648866	15	0,005	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,657382	16	0,00533333	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,659869	17	0,00566667	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,684119	18	0,006	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,705893	19	0,00633333	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,778719	20	0,00666667	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,781793	21	0,007	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,781837	22	0,00733333	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,793447	23	0,00766667	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,812583	24	0,008	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,830027	25	0,00833333	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,848066	26	0,00866667	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,865622	27	0,009	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,867025	28	0,00933333	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,871958	29	0,00966667	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,908262	30	0,01	0

Tabla 36: Resultados *GABRA4* modelo dominante.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,056928	1	0,00033333	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,214166	2	0,00066667	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,218285	3	0,001	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,2837	4	0,00133333	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,305773	5	0,00166667	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,46954	6	0,002	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,503704	7	0,00233333	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,511189	8	0,00266667	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs1512142	0,524444	9	0,003	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,530973	10	0,00333333	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,535176	11	0,00366667	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,578184	12	0,004	0
rs2271429 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,582007	13	0,00433333	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,583012	14	0,00466667	0
rs1512130 - rs3792211 - rs6447520 - rs1159315	0,590571	15	0,005	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,596678	16	0,00533333	0
rs13140528 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,599565	17	0,00566667	0
rs9291296 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,651478	18	0,006	0
rs2271429 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,665468	19	0,00633333	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,734651	20	0,00666667	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,750613	21	0,007	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,761304	22	0,00733333	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,785128	23	0,00766667	0
rs9291296 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,787149	24	0,008	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,873692	25	0,00833333	0
rs6447517 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,883175	26	0,00866667	0
rs1512130 - rs11735333 - rs6447520 - rs1159315	0,883779	27	0,009	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs1512142	0,964286	28	0,00933333	0
rs6447517 - rs3792211 - rs6447520 - rs4695187	0,97716	29	0,00966667	0
rs13140528 - rs11735333 - rs6447520 - rs4695187	0,979043	30	0,01	0

Tabla 37: Resultados *GABRA4* modelo recesivo.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs3811991	0,170049	1	0,0025	0
rs3811992	0,373253	2	0,005	0
rs4454083	0,624251	3	0,0075	0
rs10058132	0,86811	4	0,01	0

Tabla 38: Resultados *GABRA6* modelo aditivo.

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs3811991	0,014614	1	0,0025	0
rs10058132	0,073885	2	0,005	0
rs3811992	0,631959	3	0,0075	0
rs4454083	0,726343	4	0,01	0

Tabla 39: Resultados *GABRA6* modelo dominante.

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs3811991	0,016307	1	0,0025	0
rs10058132	0,078471	2	0,005	0
rs3811992	0,627635	3	0,0075	0
rs4454083	0,672185	4	0,01	0

Tabla 40: Resultados *GABRA6* modelo recesivo.

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1470208 - rs4695229	0,356921	1	0,00333333	0
rs1470208 - rs6284	0,740283	2	0,00666667	0
rs1470208 - rs4695226	0,812371	3	0,01	0

Tabla 41: Resultados *GABRB1* modelo aditivo.

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1470208 - rs4695229	0,260817	1	0,00333333	0
rs1470208 - rs4695226	0,721591	2	0,00666667	0
rs1470208 - rs6284	0,734072	3	0,01	0

Tabla 42: Resultados *GABRB1* modelo dominante.

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1470208 - rs6284	0,298939	1	0,00333333	0
rs1470208 - rs4695226	0,810829	2	0,00666667	0
rs1470208 - rs4695229	0,916816	3	0,01	0

Tabla 43: Resultados *GABRB1* modelo recesivo.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs187269 - rs7707429 - rs17522737	0,732449	1	0,005	0
rs1816071 - rs7707429 - rs17522737	0,932921	2	0,01	0

**Tabla 44: Resultados GABRB2 modelo aditivo.**

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1816071 - rs7707429 - rs17522737	0,4116	1	0,005	0
rs187269 - rs7707429 - rs17522737	0,552171	2	0,01	0

**Tabla 45: Resultados GABRB2 modelo dominante.**

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1816071 - rs7707429 - rs17522737	0,019533	1	0,005	0
rs187269 - rs7707429 - rs17522737	0,020135	2	0,01	0

**Tabla 46: Resultados GABRB2 modelo recesivo.**

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs13140445 - rs1497559	0,016633	1	0,00333333	0
rs12374299 - rs1497559	0,077355	2	0,00666667	0
rs1826923 - rs1497559	0,106347	3	0,01	0

**Tabla 47: Resultados GABRG1 modelo aditivo.**

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs13140445 - rs1497559	0,022345	1	0,00333333	0
rs1826923 - rs1497559	0,111588	2	0,00666667	0
rs12374299 - rs1497559	0,183149	3	0,01	0

**Tabla 48: Resultados GABRG1 modelo dominante.**

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1826923 - rs1497559	0,209369	1	0,00333333	0
rs12374299 - rs1497559	0,370911	2	0,00666667	0
rs13140445 - rs1497559	0,551408	3	0,01	0

**Tabla 49: Resultados GABRG1 modelo recesivo.**

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs211037	0,154202	1	0,005	0
rs211013	0,17926	2	0,01	0

**Tabla 50: Resultados *GABRG2* modelo aditivo.**

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs211037	0,407222	1	0,005	0
rs211013	0,447201	2	0,01	0

**Tabla 51: Resultados *GABRG2* modelo dominante.**

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs211037	0,380756	1	0,005	0
rs211013	0,436782	2	0,01	0

**Tabla 52: Resultados *GABRG2* modelo recesivo.**

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs929762 - rs1862242	0,472669	1	0,00333333	0
rs929762 - rs10054743	0,855721	2	0,00666667	0
rs929762 - rs2303135	0,90387	3	0,01	0

**Tabla 53: Resultados *GABRP* modelo aditivo.**

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs929762 - rs1862242	0,797297	1	0,00333333	0
rs929762 - rs2303135	0,975242	2	0,00666667	0
rs929762 - rs10054743	0,983617	3	0,01	0

**Tabla 54: Resultados *GABRP* modelo dominante.**

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs929762 - rs2303135	0,117902	1	0,00333333	0
rs929762 - rs1862242	0,408458	2	0,00666667	0
rs929762 - rs10054743	0,555783	3	0,01	0

**Tabla 55: Resultados *GABRP* modelo recesivo.**

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,009262	1	2,80899E-05	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,010945	2	5,61798E-05	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,011197	3	8,42697E-05	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,011258	4	0,00011236	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,011461	5	0,000140449	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,011502	6	0,000168539	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,0121	7	0,000196629	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,013284	8	0,000224719	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,013455	9	0,000252809	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,01375	10	0,000280899	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,013868	11	0,000308989	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,01413	12	0,000337079	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,014513	13	0,000365169	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,014922	14	0,000393258	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,015179	15	0,000421348	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,015433	16	0,000449438	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,015885	17	0,000477528	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,016054	18	0,000505618	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,016421	19	0,000533708	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,016569	20	0,000561798	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,016849	21	0,000589888	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,016897	22	0,000617978	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,017783	23	0,000646067	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,018342	24	0,000674157	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,018355	25	0,000702247	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,018431	26	0,000730337	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,020501	27	0,000758427	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,021766	28	0,000786517	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,022307	29	0,000814607	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,022784	30	0,000842697	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,024792	31	0,000870787	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,025077	32	0,000898876	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,025541	33	0,000926966	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,025603	34	0,000955056	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,025808	35	0,000983146	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,02593	36	0,001011236	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,026207	37	0,001039326	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,026433	38	0,001067416	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,026883	39	0,001095506	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,027057	40	0,001123596	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,027318	41	0,001151685	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,027546	42	0,001179775	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,02769	43	0,001207865	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,028104	44	0,001235955	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,028978	45	0,001264045	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,03002	46	0,001292135	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,031823	47	0,001320225	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,032635	48	0,001348315	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,03273	49	0,001376404	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,032867	50	0,001404494	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,033125	51	0,001432584	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,033528	52	0,001460674	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,033538	53	0,001488764	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,034414	54	0,001516854	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,036316	55	0,001544944	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,03675	56	0,001573034	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,036949	57	0,001601124	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,037409	58	0,001629213	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,037745	59	0,001657303	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,039875	60	0,001685393	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,0405	61	0,001713483	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,040648	62	0,001741573	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,040904	63	0,001769663	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,040909	64	0,001797753	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,041196	65	0,001825843	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,041573	66	0,001853933	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,043273	67	0,001882022	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,043915	68	0,001910112	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,045294	69	0,001938202	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,045882	70	0,001966292	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,045944	71	0,001994382	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,046	72	0,002022472	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,046358	73	0,002050562	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,046542	74	0,002078652	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,046577	75	0,002106742	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,047183	76	0,002134831	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,049031	77	0,002162921	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,049304	78	0,002191011	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,049938	79	0,002219101	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,051401	80	0,002247191	0

Tabla 56: Extracto de los resultados *GABRR1* modelo aditivo.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO DOMINANTE					
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)	
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,117239	1	2,80899E-05	0	
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,127814	2	5,61798E-05	0	
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,127845	3	8,42697E-05	0	
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,12992	4	0,00011236	0	
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,130363	5	0,000140449	0	
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,133861	6	0,000168539	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,144015	7	0,000196629	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,146376	8	0,000224719	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,146754	9	0,000252809	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,150104	10	0,000280899	0	
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,154203	11	0,000308989	0	
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,158115	12	0,000337079	0	
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,161208	13	0,000365169	0	
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,169086	14	0,000393258	0	
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,182561	15	0,000421348	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,187167	16	0,000449438	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,190488	17	0,000477528	0	
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,192566	18	0,000505618	0	
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,209758	19	0,000533708	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,212927	20	0,000561798	0	

Tabla 57: Extracto de los resultados *GABRRI* modelo dominante.

Anexo III: Tablas de Resultados

MODELO RECESIVO					
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)	
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,000022	1	2,80899E-05	1	
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,000023	2	5,61798E-05	1	
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,000027	3	8,42697E-05	1	
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,00003	4	0,00011236	1	
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,000035	5	0,000140449	1	
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,000035	6	0,000168539	1	
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,000035	7	0,000196629	1	
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,00006	8	0,000224719	1	
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,000288	9	0,000252809	0	
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,000317	10	0,000280899	0	
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,000416	11	0,000308989	0	
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,000475	12	0,000337079	0	
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,000582	13	0,000365169	0	
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,000597	14	0,000393258	0	
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,000601	15	0,000421348	0	
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,000758	16	0,000449438	0	
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,000821	17	0,000477528	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,000831	18	0,000505618	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,000882	19	0,000533708	0	
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,000887	20	0,000561798	0	
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,000906	21	0,000589888	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,00093	22	0,000617978	0	
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,001003	23	0,000646067	0	
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,001271	24	0,000674157	0	
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,001284	25	0,000702247	0	
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,001668	26	0,000730337	0	
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,001695	27	0,000758427	0	
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,001741	28	0,000786517	0	

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,001872	29	0,000814607	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,001897	30	0,000842697	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,001939	31	0,000870787	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,001953	32	0,000898876	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,001955	33	0,000926966	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,00206	34	0,000955056	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,002427	35	0,000983146	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,0043	36	0,001011236	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,004424	37	0,001039326	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,004506	38	0,001067416	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,00452	39	0,001095506	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,004673	40	0,001123596	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,004715	41	0,001151685	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,004718	42	0,001179775	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,00537	43	0,001207865	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,006097	44	0,001235955	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,006289	45	0,001264045	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,006303	46	0,001292135	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,006628	47	0,001320225	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,006737	48	0,001348315	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,006852	49	0,001376404	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,007179	50	0,001404494	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,007198	51	0,001432584	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,007338	52	0,001460674	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,007366	53	0,001488764	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,007497	54	0,001516854	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,007517	55	0,001544944	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,007603	56	0,001573034	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,007654	57	0,001601124	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,007713	58	0,001629213	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,00774	59	0,001657303	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,007864	60	0,001685393	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,007871	61	0,001713483	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,007972	62	0,001741573	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,008033	63	0,001769663	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,008095	64	0,001797753	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,008213	65	0,001825843	0
rs393203- rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,008294	66	0,001853933	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,008303	67	0,001882022	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,008374	68	0,001910112	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,008414	69	0,001938202	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,008435	70	0,001966292	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,008659	71	0,001994382	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,008838	72	0,002022472	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,008879	73	0,002050562	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,008937	74	0,002078652	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,009003	75	0,002106742	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,009005	76	0,002134831	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,009024	77	0,002162921	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,00916	78	0,002191011	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,009306	79	0,002219101	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,009335	80	0,002247191	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,009452	81	0,002275281	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,009632	82	0,002303371	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,009794	83	0,002331461	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,010091	84	0,002359551	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,010153	85	0,00238764	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,010161	86	0,00241573	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,010239	87	0,00244382	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,010419	88	0,00247191	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,010421	89	0,0025	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,010471	90	0,00252809	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,010601	91	0,00255618	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,010678	92	0,00258427	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,010723	93	0,00261236	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,010879	94	0,002640449	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,011065	95	0,002668539	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,011149	96	0,002696629	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,011186	97	0,002724719	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,0112	98	0,002752809	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,011354	99	0,002780899	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,011481	100	0,002808989	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,011709	101	0,002837079	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,011712	102	0,002865169	0
rs393203- rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,011777	103	0,002893258	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,011993	104	0,002921348	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,012004	105	0,002949438	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,012023	106	0,002977528	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,012039	107	0,003005618	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,012082	108	0,003033708	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,012174	109	0,003061798	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,012307	110	0,003089888	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,012331	111	0,003117978	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,01239	112	0,003146067	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,012396	113	0,003174157	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,012417	114	0,003202247	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,012583	115	0,003230337	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,012592	116	0,003258427	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,012596	117	0,003286517	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,01264	118	0,003314607	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,012729	119	0,003342697	0
rs1331100 - rs1757815 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,012848	120	0,003370787	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013007	121	0,003398876	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,013061	122	0,003426966	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,013104	123	0,003455056	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,013107	124	0,003483146	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013238	125	0,003511236	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013416	126	0,003539326	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,01355	127	0,003567416	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,013739	128	0,003595506	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,013788	129	0,003623596	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013793	130	0,003651685	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,013914	131	0,003679775	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013926	132	0,003707865	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013938	133	0,003735955	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,013939	134	0,003764045	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013952	135	0,003792135	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,013953	136	0,003820225	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,014436	137	0,003848315	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,014583	138	0,003876404	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,014663	139	0,003904494	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,014814	140	0,003932584	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,014839	141	0,003960674	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,01484	142	0,003988764	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,014955	143	0,004016854	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,015127	144	0,004044944	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,015202	145	0,004073034	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,015205	146	0,004101124	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,015247	147	0,004129213	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,015346	148	0,004157303	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,015392	149	0,004185393	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,01554	150	0,004213483	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,015624	151	0,004241573	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,015733	152	0,004269663	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,015764	153	0,004297753	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,016014	154	0,004325843	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,016281	155	0,004353933	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,01632	156	0,004382022	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,016815	157	0,004410112	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,016818	158	0,004438202	0
rs393203- rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,016837	159	0,004466292	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,016985	160	0,004494382	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,016988	161	0,004522472	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,017133	162	0,004550562	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,01715	163	0,004578652	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,017243	164	0,004606742	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,017293	165	0,004634831	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,017365	166	0,004662921	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,017506	167	0,004691011	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,01758	168	0,004719101	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,017814	169	0,004747191	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,01782	170	0,004775281	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,017849	171	0,004803371	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,017901	172	0,004831461	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,017924	173	0,004859551	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,018065	174	0,00488764	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,018092	175	0,00491573	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,018539	176	0,00494382	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,018714	177	0,00497191	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,018726	178	0,005	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,018778	179	0,00502809	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,018881	180	0,00505618	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,019014	181	0,00508427	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,019246	182	0,00511236	0
rs1331100 - rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,019357	183	0,005140449	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,019519	184	0,005168539	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,019588	185	0,005196629	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,019677	186	0,005224719	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,019842	187	0,005252809	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,020057	188	0,005280899	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,020094	189	0,005308989	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,020188	190	0,005337079	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,020283	191	0,005365169	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,020296	192	0,005393258	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,020349	193	0,005421348	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,020362	194	0,005449438	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,020419	195	0,005477528	0
rs393203- rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,020567	196	0,005505618	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,020626	197	0,005533708	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,020697	198	0,005561798	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,020711	199	0,005589888	0
rs393203- rs13202074 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,020866	200	0,005617978	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,021098	201	0,005646067	0
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,021718	202	0,005674157	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,021891	203	0,005702247	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,02192	204	0,005730337	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,021931	205	0,005758427	0
rs1331100 - rs9362622 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,021973	206	0,005786517	0
rs393203- rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,022253	207	0,005814607	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,023056	208	0,005842697	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,023187	209	0,005870787	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,023321	210	0,005898876	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,023368	211	0,005926966	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,023572	212	0,005955056	0
rs1331100 - rs7742968 - rs9204424 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,023659	213	0,005983146	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,02383	214	0,006011236	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,02413	215	0,006039326	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,02451	216	0,006067416	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,024761	217	0,006095506	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,024801	218	0,006123596	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,025126	219	0,006151685	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,025304	220	0,006179775	0
rs393203- rs9362622 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,025447	221	0,006207865	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,025561	222	0,006235955	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,025639	223	0,006264045	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,025799	224	0,006292135	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,025965	225	0,006320225	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,026048	226	0,006348315	0
rs393203- rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,026111	227	0,006376404	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,02627	228	0,006404494	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,026356	229	0,006432584	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,026486	230	0,006460674	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,026535	231	0,006488764	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs393203- rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,026551	232	0,006516854	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,026916	233	0,006544944	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,026973	234	0,006573034	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,027012	235	0,006601124	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,027107	236	0,006629213	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,027314	237	0,006657303	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,027414	238	0,006685393	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,027445	239	0,006713483	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,027534	240	0,006741573	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,027723	241	0,006769663	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,027908	242	0,006797753	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,027937	243	0,006825843	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,0281	244	0,006853933	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,028418	245	0,006882022	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,028795	246	0,006910112	0
rs393203- rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,028992	247	0,006938202	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,029488	248	0,006966292	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,029887	249	0,006994382	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,030015	250	0,007022472	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,030306	251	0,007050562	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,030973	252	0,007078652	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,031195	253	0,007106742	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,031349	254	0,007134831	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,031509	255	0,007162921	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,031574	256	0,007191011	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,031588	257	0,007219101	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,031599	258	0,007247191	0
rs393203- rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,032109	259	0,007275281	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,032694	260	0,007303371	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,032781	261	0,007331461	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,033709	262	0,007359551	0
rs1331100 - rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,034058	263	0,00738764	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,034436	264	0,00741573	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,034554	265	0,00744382	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,034601	266	0,00747191	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,034791	267	0,0075	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,035138	268	0,00752809	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,036341	269	0,00755618	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,037179	270	0,00758427	0
rs393203- rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,037244	271	0,00761236	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,037312	272	0,007640449	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,037607	273	0,007668539	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,037675	274	0,007696629	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,038498	275	0,007724719	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,039108	276	0,007752809	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,039163	277	0,007780899	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs6902106	0,040465	278	0,007808989	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,040471	279	0,007837079	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,040477	280	0,007865169	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,04066	281	0,007893258	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,040725	282	0,007921348	0
rs393203- rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,041235	283	0,007949438	0
rs1331100 - rs1757815 - rs10944436 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,041904	284	0,007977528	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,042233	285	0,008005618	0
rs393203- rs13202074 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,042844	286	0,008033708	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,04329	287	0,008061798	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,043356	288	0,008089888	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,043523	289	0,008117978	0

Anexo III: Tablas de Resultados

Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,043698	290	0,008146067	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,044003	291	0,008174157	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,044865	292	0,008202247	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,044958	293	0,008230337	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs881293 - rs9353653 - rs12200969	0,044981	294	0,008258427	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,04529	295	0,008286517	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,045367	296	0,008314607	0
rs1331100 - rs7742968 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs12200969	0,045884	297	0,008342697	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,046268	298	0,008370787	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,046397	299	0,008398876	0
rs393203- rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,046768	300	0,008426966	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,047483	301	0,008455056	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,047525	302	0,008483146	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,047612	303	0,008511236	0
rs393203- rs13202074 - rs10944436 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,048253	304	0,008539326	0
rs1331100 - rs1757815 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,048863	305	0,008567416	0
rs1331100 - rs9362622 - rs2183648 - rs2183797 - rs2297389 - rs9353653 - rs12200969	0,048997	306	0,008595506	0
rs1331100 - rs13202074 - rs10944436 - rs2183797 - rs9444675 - rs9353653 - rs6902106	0,049886	307	0,008623596	0
rs1331100 - rs7742968 - rs2183648 - rs2150817 - rs2297389 - rs9353653 - rs6902106	0,050366	308	0,008651685	0

**Tabla 58: Extracto de los resultados GABRR1 modelo recesivo.**

Anexo I: Tablas de Resultados

MODELO ADITIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs282129 - rs282121 - rs2148174 - rs7744352	0,058467	1	0,00166667	0
rs282129 - rs9362632 - rs2148174 - rs7744352	0,066952	2	0,00333333	0
rs282129 - rs7762767 - rs2148174 - rs7744352	0,250676	3	0,005	0
rs282128 - rs282121 - rs2148174 - rs7744352	0,309468	4	0,00666667	0
rs282128 - rs9362632 - rs2148174 - rs7744352	0,791239	5	0,00833333	0
rs282128 - rs7762767 - rs2148174 - rs7744352	0,874659	6	0,01	0

**Tabla 59: Resultados GABRR2 modelo aditivo.**

MODELO DOMINANTE				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs282129 - rs282121 - rs2148174 - rs7744352	0,030339	1	0,00166667	0
rs282129 - rs9362632 - rs2148174 - rs7744352	0,069239	2	0,00333333	0
rs282129 - rs7762767 - rs2148174 - rs7744352	0,167923	3	0,005	0
rs282128 - rs282121 - rs2148174 - rs7744352	0,312789	4	0,00666667	0
rs282128 - rs9362632 - rs2148174 - rs7744352	0,82761	5	0,00833333	0
rs282128 - rs7762767 - rs2148174 - rs7744352	0,969363	6	0,01	0

**Tabla 60: Resultados GABRR2 modelo dominante.**

MODELO RECESIVO				
Marcadores	minP [P(i)]	(i)	FDR [P(o)]	P(o)-P(i)
rs282129 - rs282121 - rs2148174 - rs7744352	0,001368	1	0,00166667	1
rs282129 - rs9362632 - rs2148174 - rs7744352	0,006733	2	0,00333333	0
rs282129 - rs7762767 - rs2148174 - rs7744352	0,075279	3	0,005	0
rs282128 - rs282121 - rs2148174 - rs7744352	0,157517	4	0,00666667	0
rs282128 - rs9362632 - rs2148174 - rs7744352	0,168068	5	0,00833333	0
rs282128 - rs7762767 - rs2148174 - rs7744352	0,187624	6	0,01	0

**Tabla 61: Resultados GABRR2 modelo recesivo.**

## **ANEXO IV: BLOQUES DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO**

Anexo IV: Bloques de desequilibrio de ligamiento

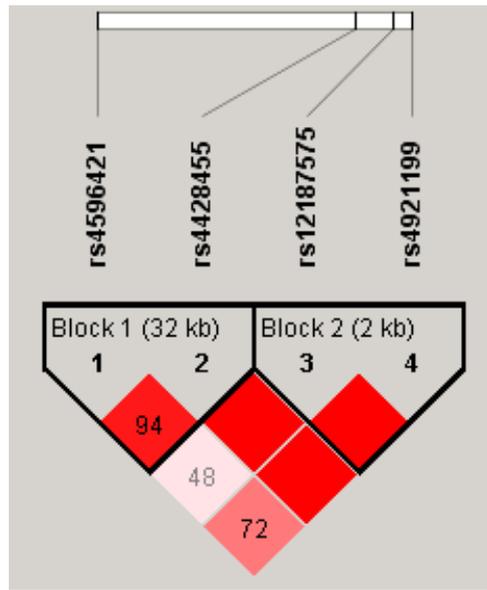


Ilustración 12: Bloques de desequilibrio de ligamiento del gen *GABRA1*.

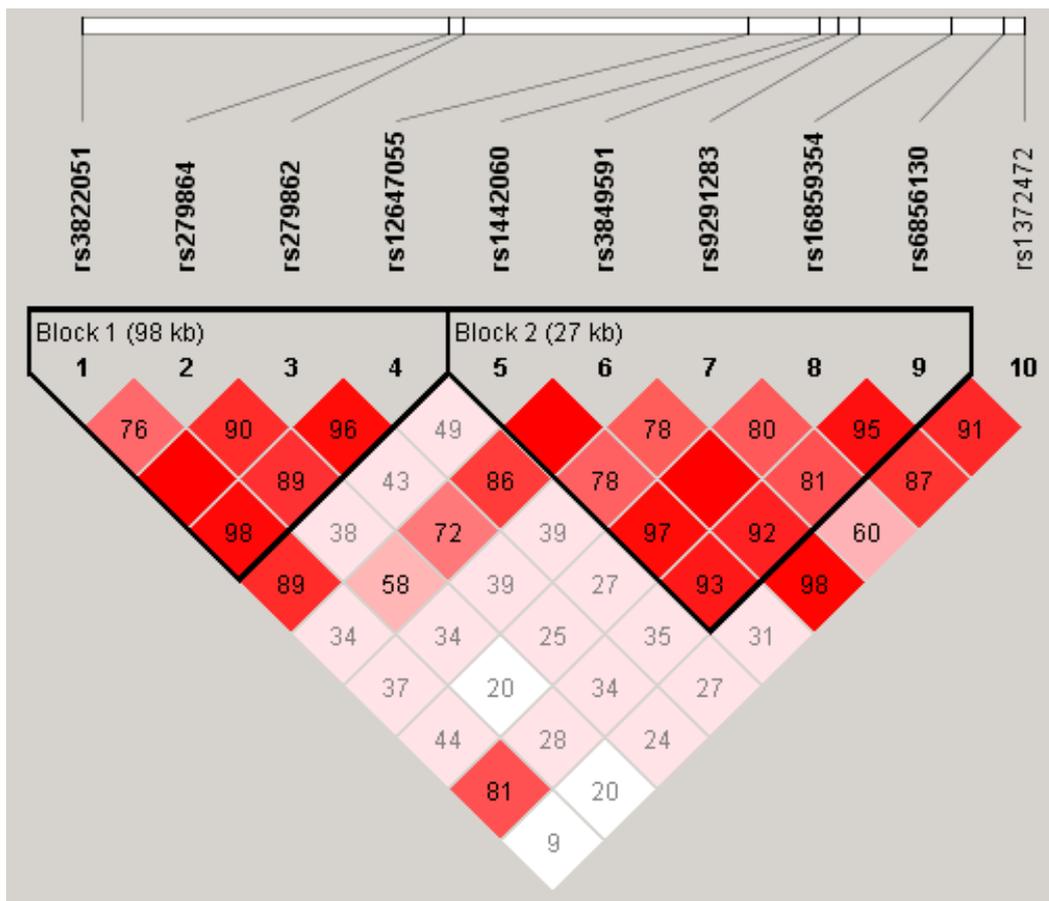


Ilustración 13: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRA2*.

Anexo IV: Bloques de desequilibrio de ligamiento.

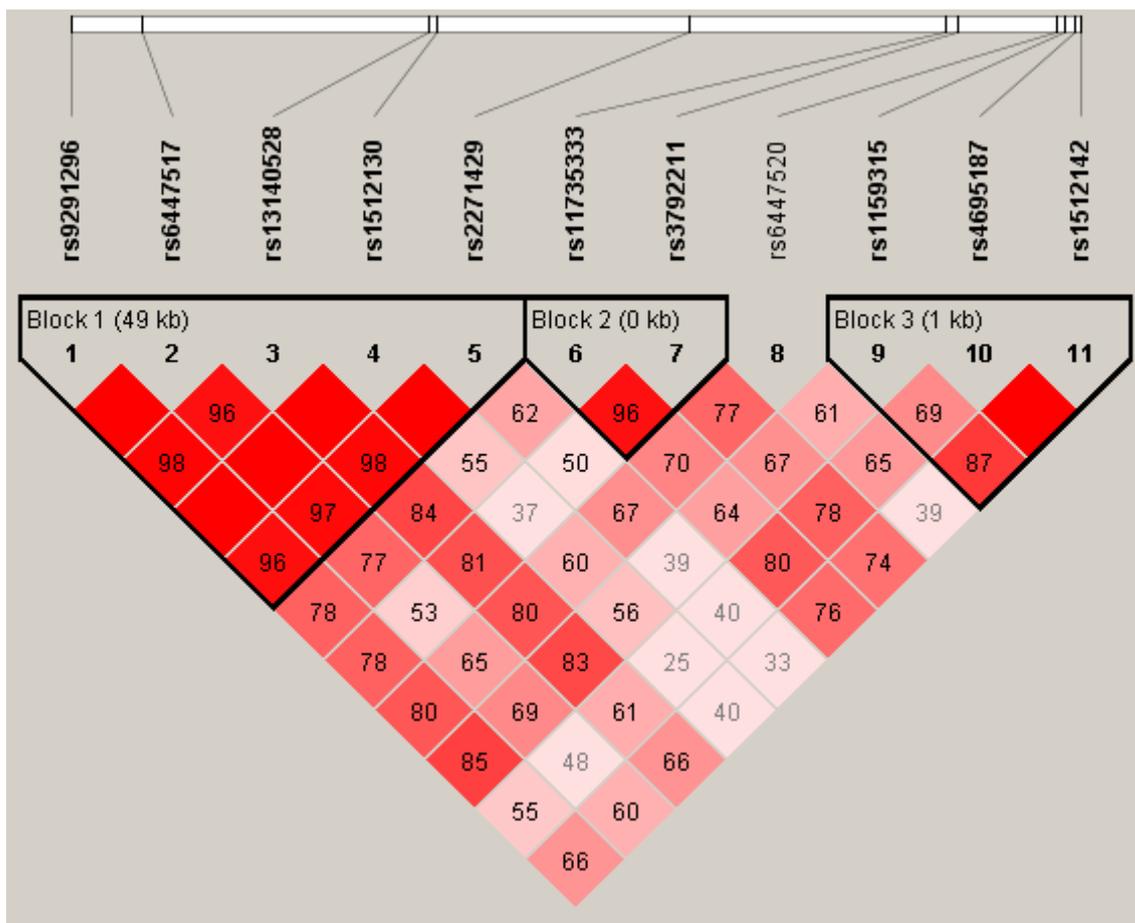


Ilustración 14: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRA4*.

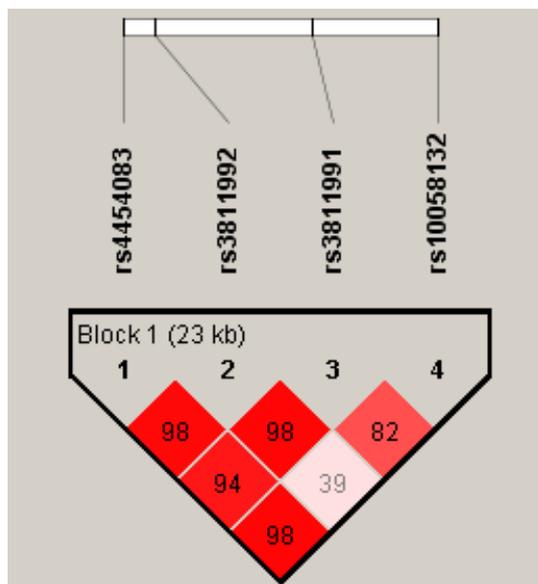


Ilustración 15: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRA6*.

Anexo IV: Bloques de desequilibrio de ligamiento.

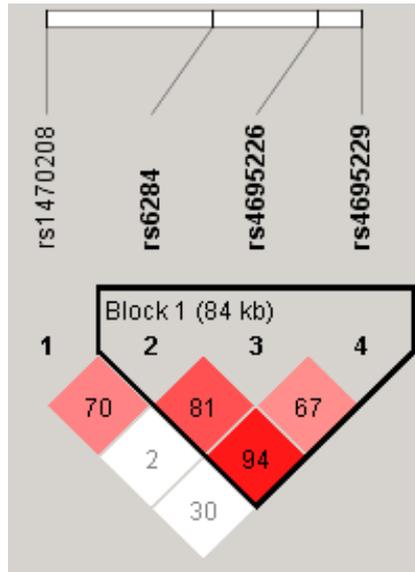


Ilustración 16: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRB1*.

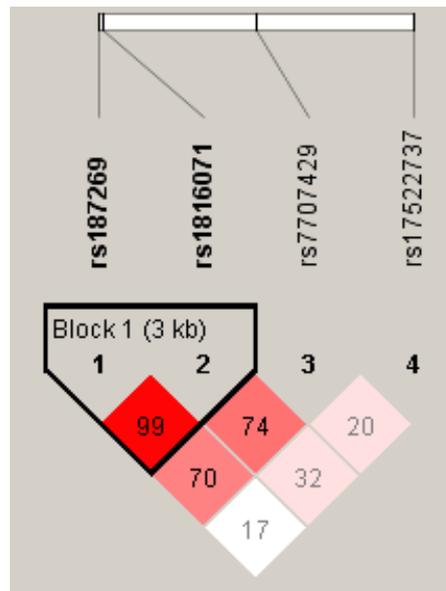


Ilustración 17: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRB2*.

Anexo IV: Bloques de desequilibrio de ligamiento.

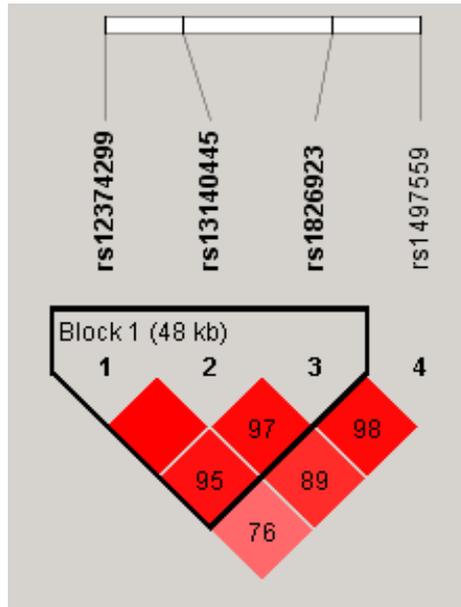


Ilustración 18: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRG1*.



Ilustración 19: Bloques de desequilibrio de ligamiento para el gen *GABRG2*.

Anexo IV: Bloques de desequilibrio de ligamiento.

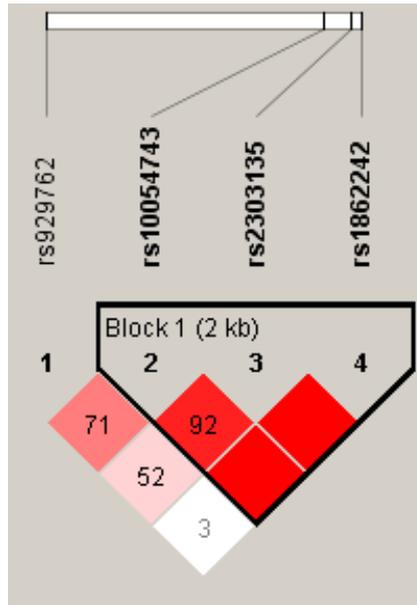


Ilustración 20: Bloques de desequilibrio de ligamiento para *GABRP*.

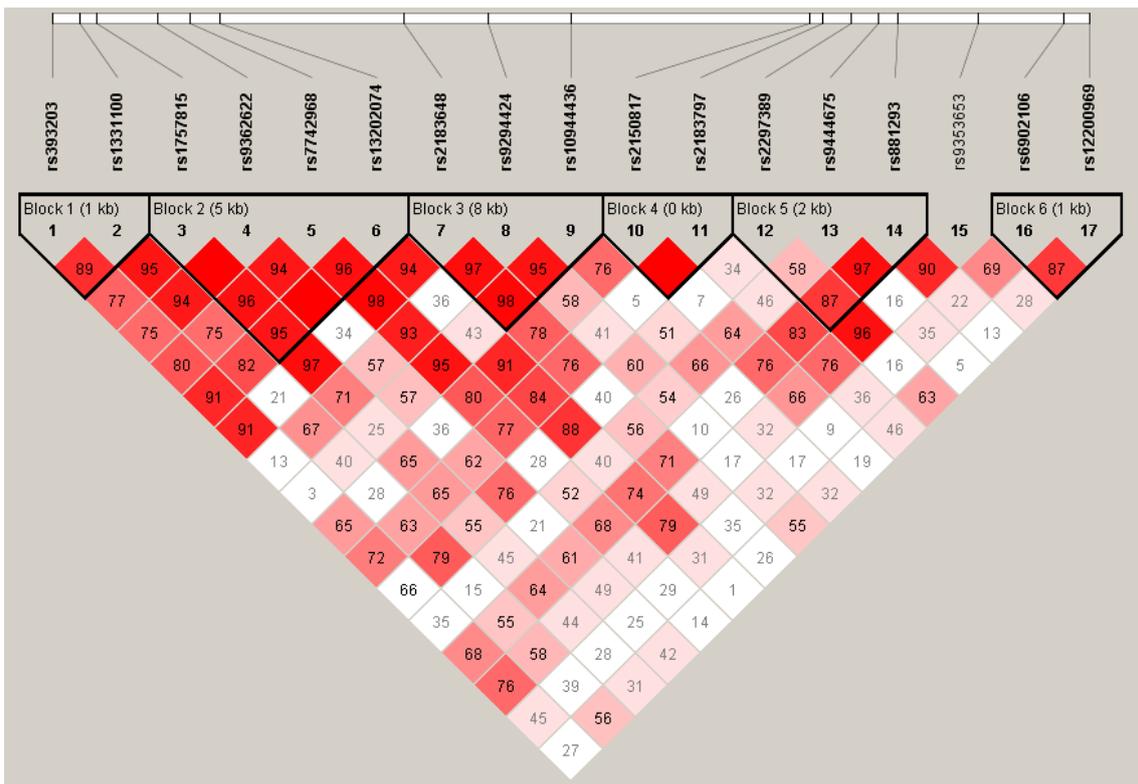


Ilustración 21: Bloques de desequilibrio de ligamiento para *GABR1*.

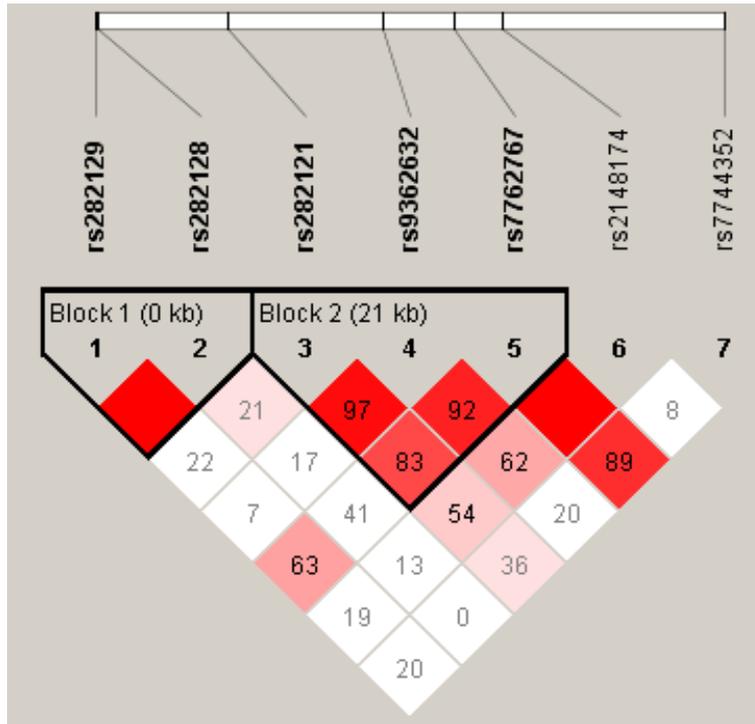


Ilustración 22: Bloques de desequilibrio de ligamiento para *GABRR2*.

## **9.- BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

- 
- <sup>1</sup> Lyons A, Petrucelli RJ. *Medicine: An Illustrated History*. New York: Harry N. Abrams, Inc, 1978: 113-5.
- <sup>2</sup> Rawlings CE, Rossich E. The history of trepanation in Africa with a discussion of its current status and continuing practice. *Surg Neurol* 1994; 41: 507-513.
- <sup>3</sup> Campillo D. *La enfermedad en la prehistoria. Historia de la medicina*. Barcelona: Salvat; 1983.
- <sup>4</sup> Dubravcic-Luksic A. Historia de la cefalea. *Revista del Instituto Médico Sucre*. 2007; LXXII (129).
- <sup>5</sup> García-Albea E. La neurología en los papiros médicos faraónicos. *Rev Neurol*. 1999; 28:430-433.
- <sup>6</sup> Hipócrates. *Sobre la enfermedad Sagrada. Tratados hipocráticos*. Madrid: Gredos; 1983; 1:399-421.
- <sup>7</sup> Areteo de Capadocia. *Obra médica*. Ed Miguel E. Pérez Molina. Libro III, *Sobre la cefalea*. Madrid: Akal/Clásica, 1998; p.100-3.
- <sup>8</sup> Galeno. *Descompositionem medicamentorum secundum locos. Opera Omnia*. Ed Kuhn; 1826.
- <sup>9</sup> Isler H. Historical background. En: *The headaches*. Olesen J, Tfelt-Hansen P, Welch KMA, eds. Raven Press, New York 1993: 1-8.
- <sup>10</sup> Singer C. The visions of Hildegard of Bingen. En: *From Magic to Science*, Anonymous. New York: Dover, 1958.
- <sup>11</sup> Willis T. *De anima brutorum*. En: *Dr Willis, practice of physic, being the whole works of the renowned and famous physician*. Londres; 1684.
- <sup>12</sup> Tissot S. *Traité de Nerfs et leurs Maladies*. Chap. XXII: De la migraine, p. 90-73.
- <sup>13</sup> Du Bois-Reymond E. Zur Kenntniss der Hemikranie. *Arch Anat Physiol Wissensch Med*. 1860;461-468.
- <sup>14</sup> Koehler PJ. Brown-Séguard's comment on Du Bois-Raymond "Hemicrania simpthicotonica". *Cephalalgia*. 1995; 15:370-372.
- <sup>15</sup> Patterson SM, Silberstein SD. Sometimes Jello helps: perceptions of headache etiology, triggers and treatment in literature. *Headache* 1993; 33: 76-81.
- <sup>16</sup> Wolff HG. *Headache and other head pains*. Nueva York: Oxford University Press; 1948.
- <sup>17</sup> Trautmann E. Die Beeinflussung migräne-tiger Zustände durch ein sympathikushem-mendersMittel (Gynergen). *Münch med Wochenschr*. 1928; 75:513.
- <sup>18</sup> Leao AA. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*. 1944; 7:359-390.
- <sup>19</sup> Headache Classification Committee of the International Headache Society. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. *Cephalalgia* 1988; 8 (suppl 7): 1-96.
- <sup>20</sup> Headache Clasification Subcommitte of International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders 2<sup>a</sup> ed. *Cephalalgia* 2004, 24 (suppl 1): 1-151.
- <sup>21</sup> Ad Hoc Committee on Classification of Headache: Classification of headache. *JAMA* 1962; 179: 717-718.
- <sup>22</sup> Titus F, Targa C, Martínez-Lage JM. Clasificación y criterios diagnósticos de las cefaleas, neuralgias craneales y dolor facial. *MCR, Barcelona* 1992.
- <sup>23</sup> Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). *The International Classification Headache Disorders, 3rd edition (beta versión)*. *Cephalalgia*. 2013; 33(9): 629-808.
- <sup>24</sup> Rasmussen BK. Epidemiology of migraine. *Biomed Pharmacother*. 1995; 49: 452-455.
- <sup>25</sup> Okumura T, Tanno S, Ohhira M, Tanno S, Nozu T. Characteristics in patients with headache in an outpatient clinic in Japan. *Asia Pac Fam Med*. 2010; 9: 10.
- <sup>26</sup> Sakai F. Clinical guideline review: Headache. *Nihon Naika Gakai Zasshi*. 2002; 91: 2411-2427.
- <sup>27</sup> Takeshima T, Ishizaki K, Fukuhara Y, Ijiri T, Kusumi M, Wakutani Y, Mori M, Kawashima M, Kowa H, Adachi Y, Urakami K, Nakashima K. Population based door-to-door Surrey of migraine in Japan: the Daisen study. *Headache*. 2004; 44: 8-19.
- <sup>28</sup> Lantéri-Minet M, Auray JP, El Hasnaoui A, Dartigues JF, Duru G, Henry P, Lucas C, Pradalier A, Chazot G, Gaudin AF. Prevalence and description of chronic daily headache in the general population in France. *Pain*. 2003; 102: 143-149.
- <sup>29</sup> Wang SJ, Fuh JL, Young YH, Lu SR, Shia BC. Prevalence of migraine in Taipei, Taiwan: a population-based survey. *Cephalalgia*. 2000; 20: 566-572.

- <sup>30</sup> Zivadinov R, Willheim K, Jurjevic A, Sepic-Grahovac D, Bucuk M, Zorzon M. Prevalence of migraine in Croatia: a population-based Survey. *Headache*. 2001; 41: 805-812.
- <sup>31</sup> Boardman HF, Thomas E, Croft PR, Millson DS. Epidemiology of headache in an English district. *Cephalalgia*. 2003; 23: 129-137.
- <sup>32</sup> Castillo J, Muñoz P, Guitera V, Pascual J. Kaplan Award 1998. Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache*. 1999; 39: 190-196.
- <sup>33</sup> D'Alessandro R, Benassi G, Lenzi PL, Gamberini G, Sacquegna T, De Carolis P, Lugaresi E. Epidemiology of headache in the Republic of San Marino. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988; 51: 21-27.
- <sup>34</sup> Dahlöf C, Linde M. One-year prevalence of migraine in Sweden: a population-based study in adults. *Cephalalgia*. 2001; 21: 664-671.
- <sup>35</sup> Hagen K, Zwart JA, Vatten L, Stovner LJ, Bovim G. Prevalence of migraine and non-migrainous headache – head-HUNT, a large population-based study. *Cephalalgia*. 2000; 20: 900-906.
- <sup>36</sup> Lampl C, Buzath A, Baumhackl U, Klingler D. One year prevalence of migraine in Austria: a nation-wide survey. *Cephalalgia*. 2003; 23: 280-286.
- <sup>37</sup> Mitsikostas DD, Tsaklakidou D, Athanasiadis N, Thomas A. The prevalence of headache in Greece: correlations to altitude and climatological factors. *Headache*. 1996; 36: 168-173.
- <sup>38</sup> Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. Epidemiology of headache in a general population a prevalence study. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1991; 44: 1147-1157.
- <sup>39</sup> Laínez MJA, Vioque J, Hernández-Aguado I, Titus F. Prevalence of migraine in Spain. An assessment of the questionnaire's validity by clinical interview. In Olesen J, ed. *Frontiers in Headache Research: Headache Classification and Epidemiology*, vol 4. New York: Raven Press 1994, pages 221-225.
- <sup>40</sup> Pascual J, Combarros O, Leno C, Polo JM, Rebollo M, Berciano J. Distribución por diagnósticos del dolor de cabeza como motivo de consulta neurológica. *Med Clin*. 1995; 104:161-164.
- <sup>41</sup> Castillo J. Epidemiología de la cefalea crónica diaria en la población general. Tesis doctoral. Universidad de Cantabria. 1999.
- <sup>42</sup> Patel NV, Bigal ME, Kolodner KB, Leotta C, Lafata JE, Lipton RB. Prevalence and impact of migraine and probable migraine in a health plan. *Neurology*. 2004; 63: 1432-1438.
- <sup>43</sup> Morillo LE, Alarcon F, Aranaga N, Aulet S, Chapman E, Conterno L, Estevez E, García Pedroza F, Garrido J, Macías-Islas M, Monzillo P, Nunez L, Plascencia N, Rodríguez C, Takeuchi Y; Latin American Migraine Study Group. Prevalence of migraine in Latin America. *Headache*. 2005; 45: 106-117.
- <sup>44</sup> Stovner LJ, Zwart JA, Hagen K, Terwindt GM, Pascual J. Epidemiology of headache in Europe. *European Journal of Neurology*. 2006; 13: 333-345.
- <sup>45</sup> Russell MB, Rasmussen BK, Thorvaldsen P, Olesen J. Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine. *International Journal of Epidemiology*. 1995; 15:612-618.
- <sup>46</sup> Nikiforow R. Headache in a random sample of 200 persons: a clinical study of a population in northern Finland. *Cephalalgia*. 1981; 1: 99-107.
- <sup>47</sup> Göbel H, Petersenn-Braun M, Soyka D. The epidemiology of headache in Germany: a nationwide survey of a representative sample on the basis of the headache classification of the International Headache Society. *Cephalalgia*. 1994; 14: 97-106.
- <sup>48</sup> Launer LJ, Terwindt GM, Ferrari MD. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study. *Neurology*. 1999; 53: 537-542.
- <sup>49</sup> Mattsson P, Svardsudd K, Lundberg PO, Westerberg CE. The prevalence of migraine in women aged 40-74 years: a population-based study. *Cephalalgia* 2000; 10:893-899.
- <sup>50</sup> Henry P, Michel P, Brochet B, Dartigues JF, Tison S, Salamon R. A nationwide survey of migraine in France: prevalence and clinical features in adults. *Cephalalgia*. 1992; 12: 229-237.
- <sup>51</sup> Kececi H, Dener S, Analan E. Co-morbidity of migraine and major depression in the Turkish population. *Cephalalgia*. 2003; 23: 271-275.
- <sup>52</sup> Crisp AH, Kalacy RS, McGuinness B, Ralph PC, Harris G. Some clinical, social and psychological characteristics of migraine subjects in the general population. *Postgraduate Medical Journal*. 1977; 53: 691-697.

- <sup>53</sup> Sakai F, Igarashi H. Prevalence of migraine in Japan: a nationwide survey. *Cephalalgia*. 1997; 17: 15-22.
- <sup>54</sup> Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache*. 2001; 41: 646-657.
- <sup>55</sup> Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD, Reed ML. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *JAMA*. 1992; 267: 64-69.
- <sup>56</sup> Metsähonkala L, Sillanpää M. Migraine in children – an evaluation of the HIS criteria. *Cephalalgia*. 1994; 14: 285-290.
- <sup>57</sup> Billie B. Migraine in school children. A study of incidence and short-term prognosis, and a clinical, psychological and electroencephalographic comparison between children with migraine and matched controls. *Acta Paediatrica*. 1962; 51: 1-151.
- <sup>58</sup> Billie B. Migraine in childhood and its prognosis. *Cephalalgia*. 1981; 1: 71-75.
- <sup>59</sup> Fernandez-de-las-Peñas C, Palacios-Ceña D, Salom-Moreno J, Lopez-de-Andres A, Hernandez-Barrera V, Jimenez-Trujillo I, Jimenez-Garcia R, Gallardo-Pino C, Garcia-Gomez-de-las-Heras MS, Carrasco-Garrido P. Has the prevalence of migraine changed over the last decade (2003-2012)? A Spanish population-based survey. *Plos One*. 2014; 249(10).
- <sup>60</sup> Lyngberg AC, Rasmussen BK, Jorgensen T, Jensen R. Has the prevalence of migraine and tension-type headache changed over a 12-year period? A Danish population survey. *Eur J Epidemiol*. 2005; 20:243-249.
- <sup>61</sup> Linde M, Stovner LJ, Zwart JA, Hagen K. Time trends in the prevalence of headache disorders. The Nord-Trøndelag Health Studies (HUNT 2 and HUNT 3). *Cephalalgia*. 2001; 31: 585-596.
- <sup>62</sup> Kelman L. The premonitory symptoms (prodrome): a tertiary care study of 893 migraineurs. *Headache*. 2004; 44 (9): 865-872.
- <sup>63</sup> Kelman L. The aura: a tertiary care study of 952 migraine patients. *Cephalalgia*. 2004; 24 (9): 728-734.
- <sup>64</sup> Milner B. Psychological defects produced by temporal lobe excision. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1958; 36: 244-257.
- <sup>65</sup> Lauritzen M. Cortical spreading depression in migraine. *Cephalalgia*. 2001; 21 (7): 757-760.
- <sup>66</sup> Kurth T, Chabriat H, Boussier MG. Migraine and stroke: a complex association with clinical implications. *Lancet Neurol*. 2012; 11 (1): 92-100.
- <sup>67</sup> Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F, Geraud G. Posterior cerebral hypoperfusion in migraine without aura. *Cephalalgia*. 2008; 28 (8): 856-862.
- <sup>68</sup> Striessnig J. Pathophysiology of migraine headache: insight from pharmacology and genetics. *DDT: Disease Mechanisms*. 2005; 2 (4): 453-461.
- <sup>69</sup> Basbaum IA, Julius D. Toward better pain control. *Sci Am*. 2006; 294 (6): 50-57.
- <sup>70</sup> Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res Rev*. 2005; 48: 438-456.
- <sup>71</sup> Stovner L, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton R, Scher A, Steiner T, Zwart JA. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia*. 2007; 27: 193-210.
- <sup>72</sup> Stovner LJ, André C; Eurolight Steering Committee. Impact of headache in Europe: a review for the Eurolight project. *J Headache Pain*. 2008; 9: 139-146.
- <sup>73</sup> Björk S, Roos P. Economic aspects of migraine in Sweden. In Working paper no 8 Institute for Health Economics, Lund. Pags 5-24.
- <sup>74</sup> Neubauer G, Uljaky R. Migraine - a disease and its costs. *Pharm Unserer Zeit*. 2002; 31: 494-497.
- <sup>75</sup> Bisdorff A, Sobocki P, Cloos JM, André C, Graziano ME; Cost of Disorders of the Brain in Europe Study Group. Cost of disorders of the brain in Luxembourg. *Bull Soc Sci Med Gran Duche Luxemb*. 2006; 3: 347-358.
- <sup>76</sup> Roijen v L, Essink-Bot ML, Koopmanschap. Societal perspective on the burden of migraine in The Netherlands. *Pharmacoeconomics*. 1995; 7: 170-179.
- <sup>77</sup> Göbel H, Buschman P, Heinze A, Heinze-Kuhn K. Epidemiology and socioeconomic consequences of migraine and headache diseases. *Versicherungsmedizin*. 2000; 52: 19-23.
- <sup>78</sup> Fiane I, Haugland M, Stovner L, Zwart JA, Bovim G, Hagen K. Sick leave is related to frequencies of migraine and non-migrainous headache – the HUNT study. *Cephalalgia*. 2006; 26: 960-967.

- <sup>79</sup> Hagen K, Vatten L, Stovner LJ, Zwart JA, Krokstad S, Bovim G. Low socio-economic status is associated with increased risk of frequent headache: a prospective study of 22718 adults in Norway. *Cephalalgia*. 2002; 22: 672-679.
- <sup>80</sup> Linde M, Dahlöf C. Attitudes and burden of disease among self-considered migraineurs – a nation-wide population-based survey in Sweden. *Cephalalgia*. 2004; 24: 455-465.
- <sup>81</sup> Hu XH, Markson LE, Lipton RB, Stewart WF, Berger ML. Burden of migraine in the United States: disability and economic costs. *Arch Intern Med*. 1999; 159: 813-818.
- <sup>82</sup> World Health Organization. World health report 2001. WHO. Geneva.
- <sup>83</sup> Turner-Bowker DM, Bayliss MS, Ware JE, Kosinski M. Usefulness of the SF-8 Health Survey for comparing the impact of migraine and other conditions. *Qual Life Res*. 2003; 12: 1003-1012.
- <sup>84</sup> Breslau N, Davis GC, Andreski P. Migraine, psychiatric disorders, and suicide attempts: an epidemiological study of young adults. *Psychiatry Research*. 1991; 37: 11-23.
- <sup>85</sup> Ulrich V, Gervil M, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. *Ann Neurol*. 1999; 45: 242-246.
- <sup>86</sup> Gervil M, Ulrich V, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. Migraine without aura: a population-based twin study. *Ann Neurol*. 1999; 46: 606-611.
- <sup>87</sup> Stewart WF, Staffa J, Lipton RB, Ottman R. Familial risk of migraine: a population-based study. *Ann Neurol*. 1997; 41: 166-172.
- <sup>88</sup> Nyholt DR, Curtain RP, Gaffney PT, Brimage P, Goadsby PJ, Griffiths LR. Migraine association and linkage analyses of the human 5-hydroxytryptamine (5HT<sub>2A</sub>) receptor gene. *Cephalalgia*. 1996; 16: 463-467.
- <sup>89</sup> Juhasz G, Zsombok T, Laszik A, Gonda X, Sotonyi P, Falupi G, Bagdy G. Association analysis of 5-HTTLPR variants, 5-HT<sub>2a</sub> receptor gene 102T/C polymorphism and migraine. *J. Neurogenet*. 2003; 17: 231-240.
- <sup>90</sup> Racchi M, Leone M, Porrello E, Rigamonti A, Govoni S, Sironi M, Montomoli C, Bussone G. Familial migraine with aura: association study with 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> and hSERT polymorphisms. *Headache*. 2004; 44: 311-317.
- <sup>91</sup> Johnson MP, Lea RA, Curtain RP, MacMillan JC, Griffiths LR. An investigation of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene as a migraine candidate gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003; 117B: 86-89.
- <sup>92</sup> Oterino A, Castillo J, Pascual J, Cayon A, Alonso A, Ruiz-Alegria C, Valle N, Monton F, Ruiz-Lavilla N. Genetic association study and meta-analysis of the HTR<sub>2C</sub> Cys23Ser polymorphism and migraine. *J Headache Pain*. 2007; 8: 231-235.
- <sup>93</sup> Marziniak M, Mossner R, Schmitt A, Lesch KP, Sommer C. A functional serotonin transporter gene polymorphism is associated with migraine with aura. *Neurology*. 2005; 64: 157-159.
- <sup>94</sup> Todt U, Freudenberg J, Goebel I, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Rietschel M, Gobel H, Kubisch C. Variation of the serotonin transporter gene SLC6A4 in susceptibility to migraine with aura. *Neurology*. 2006; 67: 1707-1709.
- <sup>95</sup> Schürks M, Rist PM, Kurth T. STin2 VNTR polymorphism in the serotonin transporter gene and migraine: pooled and meta-analyses. *J Headache Pain*. 2010; 11: 317-326.
- <sup>96</sup> Schürks M, Rist PM, Kurth T. 5-HTTLPR polymorphism in the serotonin transporter gene and migraine: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia*. 2010; 30: 1296-1305.
- <sup>97</sup> Erdal N, Herken H, Yilmaz M, Erdal E, Bayazit YA. The A218C polymorphism of tryptophan hydroxylase gene and migraine. *J Clin Neurosci*. 2007; 14: 249-251.
- <sup>98</sup> Jung A, Hüge A, Kuhlenbäumer G, Kempt S, Seehafer T, Evers S, Berger K, Marziniak M. Genetic THP2 variants and the susceptibility for migraine: association of a TPH2 haplotype with migraine without aura. *J Neural Transm*. 2010; 117: 1253-1260.
- <sup>99</sup> Corominas R, Sobrido MJ, Ribases M, Cuenca-Leon E, Blanco-Arias P, Narberhaus B, Roig M, Leira R, Lopez-Gonzalez J, Macaya A, Cormand B. Association study of the serotonergic system in migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010; 153B: 177-184.
- <sup>100</sup> Akerman S, Goadsby PJ. Dopamine and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia*. 2007; 27: 1308-1314.

- <sup>101</sup> Cader ZM, Noble-Topham S, Dyment DA, Cherny SS, Brown JD, Rice GPA, Ebers GC. Significant linkage to migraine with aura on chromosome 11q24. *Hum. Molec. Genet.* 2003; 12: 2511-2517.
- <sup>102</sup> Peroutka SJ, Wilhoit T, Jones K. Clinical susceptibility to migraine with aura is modified by dopamine D2 receptor (DRD2) NcoI alleles. *Neurology.* 1997; 49: 201-206.
- <sup>103</sup> Lea RA, Dohy A, Jordan K, Quinlan S, Brimage PJ, Griffiths LR. Evidencer for allelic association of the dopamine beta-hydroxylase gene (DBH) with susceptibility to typical migraine. *Neurogenetics.* 2000; 3: 35-40.
- <sup>104</sup> McCallum LK, Fernandez F, Quinlan S, Macartney DP, Lea RA, Griffiths LR. Association study of a functional variant in intron 8 of the dopamine transporter gene and migraine susceptibility. *Eur J Neurol.* 2007; 14: 706-707.
- <sup>105</sup> Fernandez F, Colson N, Quinlan S, Macmillan J, Lea RA, Griffiths LR. Association between migraine and functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus. *Neurogenetics.* 2009; 3: 82-87.
- <sup>106</sup> Corominas R, Ribases M, Camiña M, Cuenca-Leon E, Pardo J, Boronat S, Sobrido MJ, Cormand B, Macaya A. Two-stage case-control association study of dopamine-related genes and migraine. *BMC Med Genet.* 2009; 10: 95.
- <sup>107</sup> Todt U, Netzer C, Toliat M, Heinze A, Goebel I, Nürnberg P, Göbel H, Freudenberg J, Kubisch C. New genetic evidence for involvement of the dopamine system in migraine with aura. *Hum Genet.* 2009; 125: 265-279.
- <sup>108</sup> McCormick DA. GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 1989; 62: 1018-1027.
- <sup>109</sup> Kowa H, Shimomura T, Takahashi K. Platelet gamma-aminobutyric acid levels in migraine and tension-type headache. *Headache.* 1992; 32: 229-232.
- <sup>110</sup> Marukawa H, Shimomura T, Takahashi K. Salivary substance P, 5-hydroxytryptamine, and gamma-aminobutyric acid levels in migraine and tension-type headache. *Headache.* 1996; 36: 100-104.
- <sup>111</sup> Vieira DS, Naffah-Mazacoratti MG, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Faulhaber MH, Cavalheiro EA, Peres MF. Cerebrospinal fluid GABA levels in chronic migraine with and without depression. *Brain Res.* 2006; 1090: 197-201.
- <sup>112</sup> Fernandez F, Esposito T, Lea RA, Colson NJ, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Griffiths LR. Investigation of gammaaminobutyric acid (GABA) A receptors genes and migraine susceptibility. *BMC Med Genet.* 2008; 9: 109.
- <sup>113</sup> Nyholt DR, Dawkins JL, Brimage PJ, Goadsby PJ, Nicholson GA, Griffiths LR. Evidence for an X-linked genetic component in familial typical migraine. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 459-463.
- <sup>114</sup> Netzer C; Freudenberg J, Goliat MR, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Thiele H, Goebel I, Nurnberg P, Ptacek LJ, Gobel H, Todt U, Kubish C. Genetic association studies of the chromosome 15 GABA-A receptor cluster in migraine with aura. *Am J Med Genetic B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147B: 37-41.
- <sup>115</sup> Oswell G, Kaunisto MA, Kallela M, Hämäläinen E, Antilla V, Kaprio J, Farkkila M, Wessman M, Palotie A. No association of migraine to the GABA-A receptor complex on chromosome 15. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147B: 33-36.
- <sup>116</sup> Lafreniere RG, Rouleau GA. Migraine: Role of the TRESK two-pore potassium channel. *International Journal Of Biochemistry and Cell Biology.* 2011; 43(11): 1533-1536.
- <sup>117</sup> Huang DY, Yu BW, Fan QW. Roles of TRESK, a novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, in pain pathway and general anesthesia. *Neurosci Bull.* 2008; 24: 166-172.
- <sup>118</sup> Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube MP, Marcinkiewicz MM, Ramagopalan S, Ansorge O, Brais B, Sequeiros J, Pereira-Monteiro JM, Griffiths LR, Tucker SJ, Ebers G, Rouleau GA. A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med.* 2010; 16: 1157-1160.
- <sup>119</sup> Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, Macmillan J, Griffiths LR. The estrógeno receptor 1 G594A polymorphism is associated with migraine susceptibility in two independent case/control groups. *Neurogenetics.* 2004; 5: 129-133.
- <sup>120</sup> Oterino A, Pascual J, Ruiz de Alegria C, Valle N, Castillo J, Bravo Y, Gonzalez F, Sanchez-Velasco P, Cayon A, Leyva-Cobian F, Alonso-Arranz A, Munoz P. Association of migraine and ESR1 G325C polymorphism. *Neuroreport.* 2006; 17: 61-64.

- <sup>121</sup> Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Kilpikari R, Havanka H, Harno H, Nissila M, Sako E, Ulmavirta M, Liukkonen J, Teirmaa H, Tornwall O, Jussila M, Terwilliger J, Farkkila M, Kaprio J, Palotie A, Wessman M. Testing of variants of the MTHFR and ESR1 genes in 1798 Finnish individuals to confirm the association with migraine with aura. *Cephalalgia*. 2006; 25: 1462-1472.
- <sup>122</sup> Schurks M, Rist PM, Kurth T. Sex hormone receptor gene polymorphisms and migraine: a systematic review and metaanalysis. *Cephalalgia*. 2010; 30: 1306-1328.
- <sup>123</sup> Corominas R, Ribases M, Cuenca-Leon E, Cormand B, Macaya A. Lack of association of hormone receptor polymorphisms with migraine. *Eur J Neurol*. 2009; 16: 413-415.
- <sup>124</sup> Oterino A, Toriello M, Cayon A, Castillo J, Colas R, Alonso-Arranz A, Ruiz-Alegria C, Quintela E, Monton F, Ruiz-Lavilla N, Gonzalez F, Pascual J. Multilocus analyses reveal involvement of the ESR1, ESR2 and FSHR genes in migraine. *Headache*. 2008; 48: 1438-1450.
- <sup>125</sup> Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, MacMillan J, Griffiths LR. Investigation of hormone receptor genes in migraine. *Neurogenetics*. 2005; 6: 17-23.
- <sup>126</sup> Lee H, Sininger L, Jen JC, Cha YH, Baloh RW, Nelson SF. Association of progesterone receptor with migraine-associated vertigo. *Neurogenetics*. 2007; 8: 195-200.
- <sup>127</sup> Schürks M, Zee RY, Buring JE, Kurth T. ACE D/I polymorphism, migraine, and cardiovascular disease in women. *Neurology*. 2009; 72: 650-656.
- <sup>128</sup> Toriello M, Oterino A, Pascual J, Castillo J, Colás R, Alonso-Arranz A, Ruíz-Alegría C, Quintela E, Montón F, Ruíz-Lavilla N. Lack of association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and migraine. *Headache*. 2008; 48: 1115-1119.
- <sup>129</sup> Tzourio C, El Amrani M, Poirier O, Nicaud V, Bousser MG, Alperovitch A. Association between migraine and endothelin type A receptor (ETA -231 A/G) gene polymorphism. *Neurology*. 2001; 56: 1273-1277.
- <sup>130</sup> Lemos C, Neto JL, Pereira-Monteiro J, Mendonça D, Barros J, Sequeiros J, Alonso I, Sousa A. A role for endothelin receptor type A in migraine without aura susceptibility? A study in Portuguese patients. *Eur J Neurol*. 2011; 18: 649-655.
- <sup>131</sup> Kowa H, Yasui K, Takeshima T, Urakami K, Sakai F, Nakashima K. The homozygous C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for migraine. *Am J Med Genet*. 2000; 96: 762-764.
- <sup>132</sup> Kara I, Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kilic G. Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk. *Brain Res Mol*. 2003; 111: 84-90.
- <sup>133</sup> Lea RA, Ovcarić M, Sundholm J, MacMillan J, Griffiths LR. The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant C677T influences susceptibility to migraine with aura. *BMC Med*. 2004; 2: 3.
- <sup>134</sup> Scher AI, Terwindt GM, Verschuren WM, Kruit MC, Blom HJ, Kowa H, Frants RR, van den Maagdenberg AM, van Buchem M, Ferrari MD, Launer LJ. Migraine and MTHFR C677T genotype in a population-based sample. *Ann Neurol*. 2006; 59: 372-375.
- <sup>135</sup> Schürks M, Zee R, Buring J, Kurth T. MTHFR 677C-T and ACE D/I polymorphisms and migraine attack frequency in women. *Cephalalgia*. 2010; 30: 447.
- <sup>136</sup> Oterino A, Toriello M, Valle N, Castillo J, Alonso-Arranz A, Bravo Y, Ruiz-Alegria C, Quintela E, Pascual J. The relationship between homocysteine and genes of folate-related enzymes in migraine patients. *Headache*. 2010; 50: 99-108.
- <sup>137</sup> Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG, Boers GJ, den Heyer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995; 10: 111-113.
- <sup>138</sup> Wessman M, Kallela M, Kaunisto MA, Marttila P, Sobel E, Hartiala J, Oswell G, Leal SM, Papp JC, Hämäläinen E, Broas P, Joslyn G, Hovatta I, Hiekkalinna T, Kaprio J, Ott J, Cantor RM, Zwart J-A, Ilmavirta M, Havanka H, Färkkilä M, Peltonen L, Palotie A. A susceptibility locus for migraine with aura, on chromosome 4q24. *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 652-662.
- <sup>139</sup> Björnsson A, Gudmundsson G, Gudfinnsson E, Hrafnadóttir M, Benedikz J, Skúladóttir S, Kristjánsson K, Frigge ML, Kong A, Stefánsson K, Gulcher JR. Localization of a gene for migraine without aura to chromosome 4q21. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 986-993.

- <sup>140</sup> Anttila V, Kallela M, Oswell G, Kaunisto MA, Nyholt DR, Hämäläinen E, Havanka H, Ilmavirta M, Terwilliger J, Sobel E, Peltonen L, Kaprio J, Färkkilä M, Wessman M, Palotie A. Trait components provide tools to dissect the genetic susceptibility of migraine. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 79: 85-99.
- <sup>141</sup> Nyholt DR, Curtain RP, Griffiths LR. Familial typical migraine: significant linkage and localization of a gene to Xq24-28. *Hum Genet.* 2000; 107: 18-23.
- <sup>142</sup> Carlsson A, Forgren L, Nylander P-O, Hellman U, Frosman-Semb K, Holmgren G, Holmberg D, Holmberg M. Identification of a susceptibility locus for migraine with and without aura on 6p12.2-p21.1. *Neurology.* 2002; 59: 1804-1807.
- <sup>143</sup> Nyholt DR, Lafarge KS, Kallela M, Alakurtti K, Anttila V, Färkkilä M, Hämäläinen E, Kaprio J, Kaunisto MA, Heath AC, Montgomery GW, Göbel H, Todt U, Ferrari MD, Launer LJ, Frants RR, Terwindt GM, de Vries B, Verschuren WM, Brand J, Freilinger T, Pfaffenrath V, Straube A, Ballinger DG, Zhan Y, Daly MJ, Cox DR, Dichgans M, van den Maagdenberg AM, Kubisch C, Martin NG, Wessman M, Peltonen L, Palotie A. A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 3318-3331
- <sup>144</sup> Oterino A, Toriello M, Castillo J, Alonso-Arranz A, Sánchez-Velasco P, González-Quintanilla V, Colás R, Ruiz-Lavilla N, Pascual J. Family-based association study of chromosome 6p12.2-p21.1 migraine locus. *Headache.* 2012; 52 (3): 393-399.
- <sup>145</sup> Nyholt DR, Morley KI, Ferreira MAR, Medland SE, Boomsma DI, Heath AC, Merikangas KR, Montgomery GW, Martin NG. Genomewide significant linkage to migrainous headache on chromosome 5q21. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 77: 500-512.
- <sup>146</sup> Soragna D, Vettori A, Carraro G, Marchioni E, Vazza G, Bellini S, Tupler R, Savoldi F, Mostacciolo ML. A locus for migraine without aura maps on chromosome 14q21.2-q22.3. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 161-167.
- <sup>147</sup> Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SMG, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen G-JB, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell.* 1996; 87: 543-552.
- <sup>148</sup> Jones KW, Ehm MG, Pericak-Vance MA, Haines JL, Boyd PR, Peroutka SJ. Migraine with aura susceptibility locus on chromosome 19p13 is distinct from the familial hemiplegic migraine locus. *Genomics.* 2001; 78: 150-154.
- <sup>149</sup> McCarthy LC, Hosford DA, Riley JH, Bird MI, White NJ, Hewett DR, Peroutka SJ, Griffiths LR, Boyd PR, Lea RA, Bhatti SM, Hosking LK, Hood CM, Jones KW, Handley AR, Rallan R, Lewis KF, Yeo AJM, Williams PM, Priest RC, Khan P, Donnelly C, Lumsden SM, O'Sullivan J, See CG, Smart DH, Shaw-Hawkins S, Patel J, Langrish TC, Feniuk W, Knowles RG, Thomas M, Libri V, Montgomery DS, Manasco PK, Xu C-F, Dykes C, Humphrey PPA, Roses AD, Purvis IJ. Single-nucleotide polymorphism alleles in the insulin receptor gene are associated with typical migraine. *Genomics.* 2001; 78: 135-149.
- <sup>150</sup> Curtain R, Tajouri L, Lea R, MacMillan J, Griffiths L. No mutations detected in the INSR gene in a chromosome 19p13 linked migraine pedigree. *Eur J Med Genet.* 2006; 49: 57-62.
- <sup>151</sup> Smith RA, Curtain R, Ovcarić M, Tajouri L, MacMillan J, Griffiths L. Investigation of the NOTCH3 and TNFSF7 genes on C19p13 as candidates for migraine. *Open Neurol J.* 2008; 2: 1-7.
- <sup>152</sup> Gardner K, Barmada MM, Ptacek LJ, Hoffman EP. A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31. *Neurology.* 1997; 49: 1231-1238.
- <sup>153</sup> Lea RA, Shepherd AG, Curtain RP, Nyholt DR, Quinlan S, Brimage PJ, Griffiths LR. A typical migraine susceptibility region localized to chromosome 1q31. *Neurogenetics.* 2002; 4: 17-22.
- <sup>154</sup> Fernandez F, Curtain RP, Colson NJ, Ovcarić M, Macmillan J, Griffiths LR. Association analysis of chromosome 1 migraine candidate genes. *BMC Med Genet.* 2007; 8: 57.
- <sup>155</sup> Russo L, Mariotti P, Sangiorgi E, Giordano T, Ricci I, Lupi F, Chiera R, Guzzetta F, Neri G, Gurrieri F. A new locus for migraine with aura in the 15q11-q13 genomic region containing three GABA-A receptor genes. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 76: 327-333.
- <sup>156</sup> Krishnan SN, Desai T, Wrad DC, Haddad GG. Isolation and chromosomal localization of a human ATP-regulated potassium channel. *Human Genet.* 1995; 96: 155-160.

- <sup>157</sup> Novakovic SD, Eglen RM, Hunter JC. Regulation of Na<sup>+</sup> channel distribution in the nervous system. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 473-478.
- <sup>158</sup> Lerma J, Paternain AV, Rodriguez-Moreno A, Lopez-Garcia JC. Molecular physiology of kainate receptor. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 971-998.
- <sup>159</sup> Steiner TJ, Findley LJ, Yuen AW. Lamotrigine versus placebo in the prophylaxis of migraine with and without aura. *Cephalalgia.* 1997; 17: 109-112.
- <sup>160</sup> Anttila V, Nyholt DR, Kallela M, Artto V, Vepsäläinen S, Jakkula E, Wennerstrom A, Tikka-Kleemola P, Kaunisto MA, Hämäläinen E, Widén E, Terwilliger J, Merikangas K, Montgomery GW, Martin NG, Daly M, Kaprio J, Peltonen L, Färkkilä M, Wessman M, Palotie A. Consistently replicating locus linked to migraine on 10q22-q23. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 82: 1051-1063.
- <sup>161</sup> Deprez L, Peeters K, Van Paesschen W, Claeys KG, Claes LR, Suls A, Audenaert D, Van Dyck T, Goossens D, Del-Favero J, De Jonghe P. Familial occipitotemporal lobe epilepsy and migraine with visual aura: linkage to chromosome 9q. *Neurology.* 2007; 68: 1995-2002.
- <sup>162</sup> Teive HA, Piovesan EJ, Kowacs PA, Werneck LC. Familial occipitotemporal lobe epilepsy and migraine with aura: linkage to chromosome 9q: new evidence for a genetic link between epilepsy and migraine (Letter). *Neurology.* 2008; 70: 896.
- <sup>163</sup> Tikka-Kleemola P, Artto V, Vepsäläinen S, Sobel EM, Rätty S, Kaunisto MA, Anttila V, Hämäläinen E, Sumelahti ML, Ilmavirta M, Färkkilä M, Kallela M, Palotie A, Wessman M. A visual migraine aura locus maps to 9q21-q22. *Neurology.* 2010; 74: 1171-1177.
- <sup>164</sup> Joutel A, Bousser M-G, Bioussé V, Labauge P, Chabriat H, Nibbio A, Maciazek J, Meyer B, Bach M-A, Weissenbach J, Lathrop GM, Tournier-Lasserre E. A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nature Genet.* 1993; 5: 40-45.
- <sup>165</sup> Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha (1<sup>a</sup>)-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet.* 1997; 15: 62-69.
- <sup>166</sup> Echenne B, Ducros A, Rivier F, Joutel A, Humbertclaude V, Roubertie A, Azais M, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Recurrent episodes of coma: an unusual phenotype of familial hemiplegic migraine with linkage to chromosome 1. *Neuropediatrics.* 1999; 30: 214-217.
- <sup>167</sup> Ducros A, Joutel A, Vahedi K, Cecillon M, Ferreira A, Bernard E, Verier A, Echenne B, Lopez de Munain A, Bousser M-G, Tournier-Lasserre E. Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21-q23 and evidence of further heterogeneity. *Ann. Neurol.* 1997; 42: 885-890.
- <sup>168</sup> De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, Ballabio A, Aridon P, Casari G. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha-2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nature Genet.* 2003; 33: 192-196.
- <sup>169</sup> Spadaro M, Ursu S, Lehmann-Horn F, Veneziano L, Antonini G, Giunti P, Frontali M, Jurkat-Rott K. A G301R Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mutation causes familial hemiplegic migraine type 2 with cerebellar signs. *Neurogenetics* 2004; 5: 177-185.
- <sup>170</sup> Valmolkot KRJ, Kors EE, Hottenga J-J, Terwindt GM, Haan J, Hoefnagels WAJ, Black DF, Sandkuijl LA, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AMJM. Novel mutations in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann. Neurol.* 2003; 54: 360-366.
- <sup>171</sup> Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A, Nazos K, Crippa F, Baschiroto C, Zucca C, Bersano A, Dolcetta D, Boneschi FM, Barone V, Casari G. A novel mutation in the ATP1A2 gene causes alternating hemiplegia of childhood. *J. Med. Genet.* 2004; 41: 621-628.
- <sup>172</sup> Swoboda KJ, Kanavakis E, Xaidara A, Johnson JE, Leppert MF, Schlesinger-Massart MB, Ptacek LJ, Silver K, Youroukos S. Alternating hemiplegia of childhood or familial hemiplegic migraine?: a novel ATP1A2 mutation. *Ann. Neurol.* 2004; 55: 884-887.
- <sup>173</sup> Ambrosini A, D'Onofrio M, Grieco GS, Di Mambo A, Montagna G, Fortini D, Nicoletti F, Nappi G, Sances G, Schoenen J, Buzzi MG, Santorelli FM, Pierelli F. Familial basilar migraine associated with a new mutation in the ATP1A2 gene. *Neurology.* 2005; 66: 1826-1828.

- <sup>174</sup> Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AMJM, Pusch M, Strom TM. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet*. 2005; 366: 371-377.
- <sup>175</sup> Goadsby PJ, Kullman DM. Another migraine gene. *Lancet*. 2005; 366: 345-346.
- <sup>176</sup> Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature Neurosci*. 2006; 9: 1142-1149.
- <sup>177</sup> Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Dibbens LM, Berkovic SF, Harkin LA. SCN1A mutations and epilepsy. *Hum. Mutat*. 2005; 25: 535-542.
- <sup>178</sup> Mantegazza M, Gambardella A, Rusconi R, Schiavon E, Annesi F, Cassulini RR, Labate A, Carrideo S, Chifari R, Canevini MP, Canger R, Franceschetti S, Annesi G, Wane E, Quattrone A. Identification of an Na(v)1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 2005; 102: 18177-18182.
- <sup>179</sup> Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nature Genet*. 2000; 24: 343-345.
- <sup>180</sup> Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet*. 2001; 68: 1327-1332.
- <sup>181</sup> Suzuki M, Van Paesschen W, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, De Jonghe P, Li Y, Sekine T, Igarashi T, Fujimoto I, Mikoshiba K, Shimadzu M, Shiohara M, Braverman N, Al-Gazali L, Fujita T, Seki G. Defective membrane expression of the Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15963-15968.
- <sup>182</sup> Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev*. 2003; 83: 1183-1221.
- <sup>183</sup> Anttila V, Stefansson H, Kallela M, Todt U, Terwindt GM, Calafato MS, Nyholt DR, Dimas AS, Freilinger T, Müller-Myhsok B, Artto V, Inouye M, Alakurtti K, Kaunisto MA, Hämäläinen E, de Vries B, Stam AH, Werllner CM, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Goebel I, Borck G, Göbel H, Steinberg S, Wolf C, Björnsson A, Gudmundsson G, Kirchmann M, Hauge A, Werge T, Schoenen J, Eriksson JG, Hagen K, Stovner L, Wichmann HE, Meitinger T, Alexander M, Moebus S, Schreiber S, Aulchenko YS, Breteler MM, Uitterlinden AG, Hofman A, van Duijn CM, Tikka-Kleemola P, Vepsäläinen S, Lucae S, Tozzi F, Muglia P, Barret J, Kaprio J, Färkkilä M, Peltonen L, Stefansson K, Zwart JA, Ferrari MD, Olesen JM, Daly M, Wessman M, van den Maagdenberg AM, Dischgans M, Kubisch C, Dermitzakis ET, Frants RR, Palotie A; International Headache Genetics Consortium. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet*. 2010; 42: 869-873.
- <sup>184</sup> Ligthart L, de Vries B, Smith AV, Ikram MA, Amin N, Hottenga JJ, Koelewijn SC, Kattenberg VM, de Moor MH, Janssens AC, Aulchenko YS, Oostra BA, de Geus EJ, Smit JH, Zitman FG, Uitterlinden AG, Hofman A, Willemsen G, Nyholt DR, Montgomery GW, Terwindt GM, Gudnason V, Penninx BW, Breteker M, Ferrari MD, Launer LJ, van Suijn CM, van den Maagdenberg AM, Boomsma DI. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Europ J Hum Genet*. 2011; 19(8): 901-907.
- <sup>185</sup> Chasman DI, Schürks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer LJ, Terwindt GM, van den Maagdenberg AMJM, Fendrich K, Völzke H, Ernst F, Griffiths LR, Buring JE, Kallela M, Freilinger T, Kubisch C, Ridker PM, Palotie A, Ferrari MD, Hoffmann W, Zee RYL, Kurth T. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet*. 2011; 43: 695-698.
- <sup>186</sup> Freilinger T, Anttila V, de Vries B, Malik R, Kallela M, Terwindt GM, Pozo-Rosich P, Winsvold B, Nyholt DR, VAN Oosterhout WP, Artto V, Todt U, Hamalainen E, Fernandez-Morales J, Louter MA, Kaunisto MA, Schoenen J, Raitakari O, Lehtimäki R, Vila-Pueyo M, Gobel H, Wichmann E, Sintas C, Uitterlinden AG, Hofman A, Rivadeneira F, Heinze A, Tronvik E, van Duijn CM, Kaprio J, Cormand B, Wessman M, Frants RR, Meitinger T, Muller-Myhsok B, Zwart JA, Farkkila M, Macaya A, Ferrari MD, Kubisch C, Palotie A, Dichgans M, van der Maagdenberg AM. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Gen*. 2012; 44(7): 777-782.

- <sup>187</sup> Leone M, Russell MB, Rigamonti A, Attanasio A, Grazzi L, D'Amico D, Usai S, Bussone G. Increased familial risk of cluster headache. *Neurology* 2001; 56: 1233-1236.
- <sup>188</sup> Sjöstrand C, Giedratis V, Ekblom K, Waldenlind E, Hillert J. CACNA1A gene polymorphisms in cluster headache. *Cephalalgia* 2001; 21: 953-958.
- <sup>189</sup> Haan J, van Vliet JA, Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FLMG, van den Maagdenberg AMJM, Frants RR, Ferrari MD. No involvement of the calcium channel gene (CACNA1A) in a family with cluster headache. *Cephalalgia* 2001; 21: 959-962.
- <sup>190</sup> Sjöstrand C, Modin H, Masterman T, Ekblom K, Waldenlind E, Hillert J. Analysis of nitric oxide synthase genes in cluster headache. *Cephalalgia* 2002; 22: 758-764.
- <sup>191</sup> Baumber L, Sjöstrand C, Leone M, Harty H, Bussone G, Hillert J, Trembath RC, Russell MB. A genome-wide scan and HCRTR2 candidate gene analysis in a European cluster headache cohort. *Neurology* 2006; 66: 1888-1893.
- <sup>192</sup> Rainero I, Rubino E, Valfrè W, Gallone S, De Martino P, Zampella E, Pinessi L. Association between the G1246A polymorphism of the hypocretin receptor 2 gene and cluster headache: a meta-analysis. *J Headache Pain*. 2007; 8: 152-156.
- <sup>193</sup> Rainero I, Rivoiro C, Gallone S, Valdrè W, Ferrero M, Angilella G, Rubino E, de Martino P, Savi L, Lo Giudice R, Pinessi L. Lack of association between the 3092T→C Clock gene polymorphism and cluster headache. *Cephalalgia*. 2005; 25: 1078-1081.
- <sup>194</sup> Cevoli S, Mochi M, Pierangeli G, Zanigni S, Grimaldi D, Bonavina G, Torelli P, Manzini GC, Cortelli P, Montagna P. Investigation of the T3111C CLOCK gene polymorphism in cluster headache. *J Neurol*. 2008; 255: 299-300.
- <sup>195</sup> Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, Lathrop GM, Chabriat H, Mas JL, Cabanis EA, Baudrimont M, Maciazek J, Bach MA, Bousser MG. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet*. 1993; 3: 256-259.
- <sup>196</sup> Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cécillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*. 1996; 6602: 707-710.
- <sup>197</sup> Ceroni M, Poloni TE, Toniatti S, Fabozzi D, Uggetti C, Frediani F, Simonetti F, Malaspina A, Alimonti D, Celano M, Ferrari M, Carrera P. Migraine with aura and white matter abnormalities: *NOTCH3* mutation. *Neurology* 2000; 54: 1869-1871.
- <sup>198</sup> Di Genaro G, Buzzi MG, Ciccarelli O, Santorelli FM, Pierelli F, Fortin D'Onofrio M, Costa A, Nappi G, Casali C. Assessing the relative incidence of mitochondrial DNA A3243G migraine without aura with maternal inheritance. *Headache* 2000; 40: 568-571.
- <sup>199</sup> Haan J, Terwindt GM, Maassen JA, Hart LM, Frants RR, Ferrari MD. Search for mitochondrial DNA mutations in migraine subgroups. *Cephalalgia* 1999;19:20-22.
- <sup>200</sup> Shimomura T, Kitano A, Marukawa H, Takahashi K. Mutation in platelet mitochondrial gene in patients with migraine. *Cephalalgia* 1995; 15(Suppl 14):10.
- <sup>201</sup> Russell MB, Diamant M, Norby S. Genetic heterogeneity of migraine with and without aura in Danes cannot be explained by mutation in mtDNA nucleotide pair 11084. *Acta Neurol Scand* 1997;96:171-173.
- <sup>202</sup> Ojaimi J, Katsabanis S, Bower S, Quigley A, Byrne E. Mitochondrial DNA in stroke and migraine with aura. *Cerebrovasc Dis* 1998;8:102-106.
- <sup>203</sup> Jen J, Cohen AH, Yue Q, Stout JT, Vinters HV, Nelson S, Baloh RW. Hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy, and stroke (HERNS). *Neurology* 1997; 49: 1322-1330.
- <sup>204</sup> Terwindt GM, Haan J, Ophoff RA, Groenen SMA, Storimans CWJM, Lanser JBK, Roos RA, Bleeker-Wagemakers EM, Frants RR, Ferrari MD. Clinical and genetic analysis of a large Dutch family with autosomal dominant vascular retinopathy, migraine and Raynaud's phenomenon. *Brain* 1998; 121: 303-316.
- <sup>205</sup> Ophoff RA, DeYoung J, Service SK, Joose M, Caffo NA, Sandkuijl LA, Terwindt GM, Haan J, van den Maagdenberg AM, Jen J, Baloh RW, Barilla-LaBarca ML, Saccone NL, Atkinson JP, Ferrari MD, Freimer NB, Frants RR. Hereditary vascular retinopathy, cerebroretinal vasculopathy, and hereditary

- endotheliopathy with retinopathy, nephropathy, and stroke map to a single *locus* on chromosome 3p21.1-p21.3. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 447-453.
- <sup>206</sup> Richards A, van den Maagdenberg AMJM, Jen JC, Kavanagh D, Bertram P, Spitzer D, Liszewski MK, Barilla-LaBarca M-L, Terwindt GM, Kasai Y, McLellan M, Gilbert Grand M, Vanmolkot KRJ, de Vries B, Wan J, Kane MJ, Mamsa H, Schäfer R, Stam AH, Haan J, de Jong PTVM, Storimans CW, van Schooneveld MJ, Oosterhuis JA, Gschwendter A, Dishgans M, Kotschet KE, Hodgkinson S, Hardy TA, Delatycki MB, Hajj-Ali RA, Kothari PH, Nelson SF, Frants RR, Baloh RW, Ferrari MD, Atkinson JP. C-terminal truncations in human 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nature Genetics*. 2007; 39: 1068-1070.
- <sup>207</sup> Kavanagh D, Spitzer D, Kothari PH, Shaikh A, Liszewski MK, Richards A, Atkinson JP. New roles for the major human 3'-5' exonuclease TREX1 in human disease. *Cell Cycle*. 2008; 7: 1718-1725.
- <sup>208</sup> Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharm Exptl Ther*. 2002; 300:2-8.
- <sup>209</sup> Fritschy JM, Brünig I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther*. 2003; 98:299-323.
- <sup>210</sup> Gao B, Fritschy JM, Benke D, Möhler H. Neuron-specific expression of GABAA receptor subtypes: differential associations of the  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience*. 1993; 54:881-892.
- <sup>211</sup> Huntsmann MM, Porcello DM, Homanics GE, DeLorey TM, Huguenard JR. Reciprocal inhibitory connections and network synchrony in the mammalian thalamus. *Science*. 1999;283:541-543.
- <sup>212</sup> Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. 2000; 101:815-850.
- <sup>213</sup> Nusser Z, Sieghart W, Stephenson FA, Somogyi P. The  $\alpha$ 6 subunit of the GABAA receptor is concentrated in both inhibitory and excitatory synapses on cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 1996;16:103-114.
- <sup>214</sup> Pörtl A, Hauer B, Fuchs K, Tretter V, Sieghart W. Subunit composition and quantitative importance of GABAA receptors subtypes in the cerebellum of mouse and rat. *J Neurochem*. 2003;87:1444-1455.
- <sup>215</sup> Drew CA, Johnston GAR, Weatherby RP. Bicuculline-insensitive GABA receptors: Studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett*. 1984;52:317-321.
- <sup>216</sup> Hill DR, Bowery NG. <sup>3</sup>H-Baclofen and <sup>3</sup>H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA sites in rat brain. *Nature*. 1981; 290:149-152.
- <sup>217</sup> Wu LG, Saggau P. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*. 1997;20:204-212.
- <sup>218</sup> Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*. 1997;19:687-695.
- <sup>219</sup> Hasler G, van der Veen JW, Tumonis T, Meyers N, Shen J, Drevets WC. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64:193-200.
- <sup>220</sup> Hasler G, van der Veen JW, Grillon C, Drevets WC, Shen J. Effect of acute psychological stress on prefrontal gamma-aminobutyric acid concentration determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Am J Psychiatry*. 2010; 167:1226-1231.
- <sup>221</sup> Rajkowska G, O'Dwyer G, Teleki Z, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ. GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32:471-482.
- <sup>222</sup> Esser D, Schule C, Baghai TC et al. Neuroactive steroids in depression and anxiety disorders: clinical studies. *Neuroendocrinology*. 2006; 84:244-254.
- <sup>223</sup> Maciag D, Hughes J, O'Dwyer G, Pride Y, Stockmeier CA, Sanacora G, Rajkowska G. Reduced density of calbindin immunoreactive GABAergic neurons in the occipital cortex in major depression: relevance to neuroimaging studies. *Biol Psychiatry*. 2010; 67:45-470.
- <sup>224</sup> Birkenhager TK, Moleman P, Nolen WA. Benzodiazepines for depression? A review of the literature. *Int Clin Psychopharmacol*. 1995; 10:181-195.

- <sup>225</sup> Hasler G, Neumeister A, van der Veen JW, Tuminis T, Bain EE, Shen J, Drevets WC, Charney DS. Normal prefrontal gamma-aminobutyric acid levels in remitted depressed subjects determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry*. 2005; 58:969-973.
- <sup>226</sup> Han I, You Y, Kordower JH, Brady ST, Morfini GA. Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: The role of cell type-specific features. *J Neurochem*. 2010; 113 (5): 1073-1091.
- <sup>227</sup> Wu JY, Bird ED, Chen MS, Huang WM. Abnormalities of neurotransmitter enzymes in Huntington's Chorea. *Neurochem Res*. 1979; 4(5): 575-586.
- <sup>228</sup> Waldvogel HJ, Faull RL. The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. *Adv Pharmacol*. 2015; 73: 223-264.
- <sup>229</sup> Parga JA, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Effects of GABA and GABA receptor inhibition on differentiation of mesencephalic precursors into dopaminergic neurons in vitro. *Dev Neurobiol*. 2007; 67(12): 1549-1559.
- <sup>230</sup> Benes FM. Post-mortem structural analyses of schizophrenic brain: study designs and the interpretation of data. *Psychiatr Dev*. 1988; 6(3): 213-226.
- <sup>231</sup> Chinchilla Moreno A. Las esquizofrenias: sus hechos y valores clínicos y terapéuticos. Ed Elsevier Doyma SL. 2007
- <sup>232</sup> Besag FMC, Patsalos PN. New developments in the treatment of partial-onset epilepsy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2012; 8: 455-464.
- <sup>233</sup> Matthew CC, Samba RD. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013; 230(2): 151-188.
- <sup>234</sup> Fatemi SH, Halt AR, Stara JM, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto GR. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry*. 2002; 52:805-810.
- <sup>235</sup> Yip J, Soghomonian J, Blatt GJ. Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications. *Acta Neuropathol*. 2007; 113:559-568.
- <sup>236</sup> Yip J, Soghomonian J, Blatt GJ. Increased GAD67 mRNA expression in cerebellar interneurons in autism: implications of Purkinje cell dysfunction. *J Neurosci Res*. 2008; 86:525-530.
- <sup>237</sup> Yip J, Soghomonian J, Blatt GJ. Decreased GAD65 mRNA levels in select subpopulations of neurons in the cerebellar dentate nuclei in autism: an in situ hybridation study. *Aut Res*. 2009; 2:50-59.
- <sup>238</sup> Blatt GJ, Fitzgerald CM, Guptill JT, Broker AB, Kemper TL, Barman ML. Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: an autoradiographic study. *J Autism Dev Disord*. 2001; 31:537-543.
- <sup>239</sup> Oblak A, Gibas TT, Blatt GJ. Decreased GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepine binding sites in the anterior cingulate cortex in autism. *Aut Res*. 2009; 2:205-219.
- <sup>240</sup> Oblak AL, Gibas TT, Blatt GJ. Reduced GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepine binding sites in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *Brain Res*. 2010
- <sup>241</sup> Miller SA, Dykes DD, Polesy HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res*. 1988; 16: 1215.
- <sup>242</sup> International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-794.
- <sup>243</sup> International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005; 437: 1299-1320.
- <sup>244</sup> International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007; 449: 851-861.
- <sup>245</sup> Alfonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 2657-2660.
- <sup>246</sup> Kutyavin IV, Luktanov EA, Gamper HB, Meyer RB. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25: 3718-2723.
- <sup>247</sup> Förster VT. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics*. 1948; 2: 55-75.
- <sup>248</sup> Lakowicz JR. Energy Transfer. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press. 1983: 303-339.

- <sup>249</sup> Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239: 487-491.
- <sup>250</sup> Rabinowitz D, Laird N. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered*. 2000; 50 (4): 211-223.
- <sup>251</sup> Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*. 1993; 52 (3): 506-516.
- <sup>252</sup> Lin DY, Zeng D. Likelihood-based inference on haplotype effects in genetic association studies. *Journal of the American Statistical Association*. 2006; 101 (473): 89-118.
- <sup>253</sup> Lin DJ, Zeng D, Millikan R. Maximum likelihood estimation of haplotype effects and haplotype-environment interactions in association studies. *Genet Epidemiol*. 2005; 29 (4): 299-312.
- <sup>254</sup> Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 2003; 19(1): 149-150.
- <sup>255</sup> Cernuda-Morollón E, Ramón C, Martínez-Cambor P, Serrano-Pertierra E, Larrosa D, Pascual J. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache*. 2014; 54 (6): 987-995.
- <sup>256</sup> 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 (5): 820-824.
- <sup>257</sup> Cox HC, Lea RA, Bellis C, Carless M, Dyer TD, Curran J, Charlesworth J, MacGregor S, Nyholt D, Chasman D, Ridker PM, Schürks M, Blangero J, Griffiths LR. A genome-wide analysis of “Bounty” descendants implicates several novel variants in migraine susceptibility. *Neurogenetics*. 2012; 13(3): 261-266.
- <sup>258</sup> Oterino A, Cayon A, Alonso A, Castillo J, Munoz-Franco I, Pascual J, Ruiz-Lavilla N. Is GABRE gene at Xq28 chromosome the X-linked migraine gene? Comunicación a Congreso Sociedad Americana de Neurología 2006.
- <sup>259</sup> Quintas M, Neto JL, Pereira-Monteiro J, Barros J, Sequeiros J, Sousa A, Alonso I, Lemos C. Interaction between gamma-aminobutyric acid A receptor genes: new evidence in migraine susceptibility. *Plos One*. 2013; 8(9): e74087.
- <sup>260</sup> Chen T, Murrell M, Fowdar J, Roy B, Greal R, Griffiths LR. Investigation of the role of the GABRG2 gene variant in migraine. *J Neurol Sci*. 2012; 318 (1-2): 112-114.
- <sup>261</sup> García-Martín E, Martínez C, Alonso-Navarro H, Benito-León J, Lorenzo-Betancor O, Pastor P, Puertas I, Rubio L, López-Alburquerque T, Agúndez JA, Jiménez-Jiménez FJ. Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor rho (GABRR) polymorphisms and risk for essential tremor. *J Neurol*. 2011; 258 (2): 203-211.
- <sup>262</sup> Xuei X, Flury-Wetherill L, Dick D, Goate A, Tischfield J, Nurnberger J Jr, Schuckit M, Kramer J, Kuperman S, Hesselbrock V, Porjesz B, Foroud T, Edenberg HJ. GABRR1 and GABRR2, encoding the GABA-A receptor subunits rho1 and rho2, are associated with alcohol dependence. *Am J Med Genet B. Neuropsychiatr Genet*. 2010; 153B(2): 418-427.
- <sup>263</sup> Blednov YA, Benavidez JM, Black M, Leiter CR, Osterndorff-Kahanek E, Johnson D, Borghese CM, Hanrahan JR, Johnston GA, Chebib M, Harris RA. GABAA receptors containing rho1 subunits contribute to in vivo effects of ethanol in mice. *Plos One*. 2014; 9(1): e85525.
- <sup>264</sup> Enz R, Brandstätter JH, Wässle H and Bormann J. Immunocytochemical localization of the GABA receptor rho subunits in the mammalian retina. *J Neurosci*. 1996; 16 (14): 4479-4490.
- <sup>265</sup> Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhi GR. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Natl Acad Sci USA*. 1991; 88 (7): 2673-2677.
- <sup>266</sup> Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem*. 1998; 70(3): 899-907.
- <sup>267</sup> Rozzo A, Armellini M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E. Expression and dendritic mRNA localization of GABA receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2002; 15 (11): 1747-1758.
- <sup>268</sup> Alakuijala A, Palgi M, Wegelius K, Schmidt M, Enz R, Paulin L, Saarma M, Pasternack M. GABA receptor rho subunit expression in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005; 154 (1): 15-23.
- <sup>269</sup> Cunha C, Monfils MH, Ledoux JE. GABA receptors in the lateral amygdala: a possible novel target for the treatment of fear and anxiety disorders?. *Front Behav Neurosci*. 2010; 4:6.

## Bibliografía

---

- <sup>270</sup> Stone RA, Liu J, Sugimoto R, Capehart C, Zhu X, Pendrak K. GABA, experimental myopia, and ocular growth in chick. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 2003; 44 (9): 3933-3946.
- <sup>271</sup> Arnaud C, Gauthier P, Gottesmann C. Study of a GABAC receptor antagonist on sleep-waking behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2001; 154 (4): 415-419.
- <sup>272</sup> Kumar K, Sharma S, Kumar P, Deshmukh R. Therapeutic potential of GABA(B) receptor ligands in drug addiction, anxiety, depression and other CNS disorders. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; 110: 174-184.
- <sup>273</sup> Johnston GA, Curtis DR, Beart PM, Game CJ, McCulloch RM, Twitchon B. Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J Neurochem.* 1975; 24(1): 157-160.
- <sup>274</sup> Zheng W, Xie W, Zhang J, Strong JA, Wang L, Yu L, Xu M, Lu L. Function of gamma-aminobutyric acid receptor/cannel rho 1 subunits in spinal cord. *J Biol Chem.* 2003; 278(48): 48321-48329.
- <sup>275</sup> Tadavarty R, Hwang J, Raiput PS, Soja PJ, Kumar U, Sastry BR. Are presynaptic GABA-C rho2 receptors involved in anti-nociception?. *Neurosci Lett.* 2015; 606: 145-150.