

Universidad De Valladolid



TITULACIÓN: MASTER EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA



**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
Y REPUESTA AL TRATAMIENTO EN
PACIENTES CON MIGRAÑA CRÓNICA**

Autor: Nicolás Navarro Ortega

Director: Juan José Tellería Orriols

VºBº Tutor

Valladolid, Julio de 2015

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 TOPIRAMATO.....	3
1.2 TOXINA BOTULÍNICA.....	4
1.3 GENES Y MIGRAÑA.....	5
2 MATERIAL Y METODOS	6
2.1 POBLACIÓN ESTUDIADA.....	6
2.2 RECOGIDA DE MUESTRAS.....	6
2.3 OBTENCION DE PELLET.....	6
2.4 EXTRACCIÓN DE DNA.....	7
2.5 CUANTIFICACIÓN DEL DNA POR NANODROP.....	9
2.6 GENOTIPADO CON SONDAS KASP.....	10
3 RESULTADOS	17
3.1 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.....	17
3.2 RESPUESTA AL TOPIRAMATO.....	18
3.3 RESPUESTA A LA TOXINA BOTULÍNICA (BOTOX®).....	20
4 DISCUSIÓN	
4.1 GENOTIPADO.....	22
4.2 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.....	23
4.3 RESPUESTA AL TOPIRAMATO.....	23
4.4 RESPUESTA A LA TOXINA BOTULÍNICA (BOTOX®).....	24
5 CONCLUSIONES	25
6 BIBLIOGRAFÍA	26

INTRODUCCIÓN

La migraña es un trastorno neurológico común asociado con dolor de cabeza, náuseas, vómitos, fotofobia, fonofobia y osmofobia, puede presentarse con o sin aura. La migraña con aura, cursa con alteraciones visuales que pueden durar una hora o a veces, varios días, también puede presentar convulsiones motoras focales. Los pacientes con al menos un ataque de migraña con aura al mes, muestran un alto riesgo de lesiones cerebrales. (Headache Classification Subcommittee of the international Headache Society, 2004).

Para definirse como migraña crónica, debe padecerse 15 días al mes o más y al menos 8 días de esos 15, con características migrañosas, en un periodo de al menos tres meses (Headache Classification Committee, 2006).

La migraña afecta aproximadamente al 11-15% de los adultos entre 18 y 65 años en todo el mundo, es tres veces más frecuente en las mujeres por factores hormonales y es más común entre edades de 22 y 55 años, siendo baja en niños y ancianos. La prevalencia de la migraña crónica es del 1,7 al 4% de la población adulta mundial. En EEUU y en la unión europea, se ha estimado que las personas con migraña crónica tienen un 25% menos de vitalidad, salud mental y capacidad laboral, que los que tienen migraña episódica (Diez et al., 2003).

La migraña es una enfermedad que incapacita a la persona que la padece, influyendo en su vida personal y laboral, las personas que sufren migraña crónica, generan menos ingresos en el hogar, tienen menos probabilidad de mantener trabajo de tiempo completo y más frecuencia de comorbilidad asociada con ansiedad, trastornos respiratorios, depresión, trastorno obsesivo-compulsivo y enfermedad cardiovascular (Blumenfeld et al., 2013; Geppetti et al., 2010). Muchos de los pacientes con migraña crónica necesitan la ayuda de psicólogos. El informe de la OMS del 2010 la sitúa entre las 10 principales causas de discapacidad del mundo y su diagnóstico y tratamiento distan mucho de ser óptimos (Vos et al., 2010).

La observación de herencia de migrañas de padres a hijos, sugiere que la migraña tiene una base genética. El 50% de los pacientes con migrañas tienen padres afectados, aparte, hay una estrecha relación entre gen y ambiente. El estrés, la dieta, la obesidad y la coexistencia con otras enfermedades sistémicas incrementan el riesgo de padecer migraña.

Se ha observado que entre el 40 y el 65% de los hijos de los pacientes con migraña con aura la padecen (Johnson et al., 2007). Los familiares de primer grado de pacientes con migraña con aura y sin aura tienen un riesgo relativo de 3,79 y 1,86 respectivamente (V.D et al., 2010).

Un estudio más preciso de la contribución genética en la migraña, ha consistido en el estudio de asociación de polimorfismos genéticos tipo SNP consistentes en variaciones de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism) y la migraña. La migraña no sigue un patrón mendeliano clásico, sino que presenta una herencia multigénica con penetrancia variable (Di Lorenzo et al., 2012). Los estudios de asociación han identificado diversos loci relacionados con la

enfermedad (1q, 1p, 4q, 5q, 5p, 6p, 6q, 9q, 11q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19p, 22q y Xq) (Johnson et al., 2007).

La migraña hemipléjica familiar (MHF) muestra un evidente origen genético. Los pacientes afectados presentan una migraña crónica con aura que incluye un déficit motor hemicorporal con duración de minutos a horas. Tiene una herencia monogénica autosómica dominante con elevada penetrancia (Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, 2004). Existen tres formas: MHF1, MHF2 y MHF3 causadas por los genes CACNA1A, ATP1A2 y SCN1A respectivamente.

CACNA1A localizado en el cromosoma 19p13.1 (Ophoff et al., 1996), codifica la subunidad alfa1A de canales calcio voltaje-dependientes CaV2.1, cuya principal función es regular la liberación de neurotransmisores a nivel de la unión neuromuscular periférica y en sinapsis centrales (Catterall, 1998).

ATP1A2 localizado en el cromosoma 1q23 codifica la subunidad alfa2 de una bomba ATPasa sodio-potasio que modula la recaptación de potasio y glutamato de la hendidura sináptica (De Fusco et al., 2003). ATP1A2 se expresa predominantemente en neuronas de neonatos y en células gliales en adultos (Moseley et al., 2003).

SCN1A localizado en el cromosoma 2q24, codifica la subunidad alfa1 de un canal de sodio voltaje dependiente implicado en la generación y propagación de potenciales de acción (Meisler and Kearney, 2005).

La mutación en cualquiera de estos genes es condición necesaria pero no suficiente para padecer MHF; para ello deben coexistir otras mutaciones o factores desconocidos que modifican la penetrancia.

Con el tratamiento adecuado de la migraña crónica, se puede reducir la significativa pérdida de productividad que genera y elevar la calidad de vida de los sujetos que la padecen, a corto y a largo plazo.

Recientemente, dos tratamientos han sido respaldados por varios trabajos por su eficacia preventiva en contraposición al placebo, primero fue el topiramato, (aunque el 20% de los pacientes abandonaba el tratamiento a consecuencia de los efectos adversos) y más tarde se estudió la toxina botulínica. (Dodick et al., 2010; Silberstein et al., 2007; Pascual et al., 2004)

Aunque se desconocen los mecanismos que desencadenan la migraña crónica, existen evidencias de que está relacionada con cambios morfológicos, funcionales y químicos en el sistema nervioso central. (Aurora et al., 2011; Mathew et al., 2011).

Topiramato.

Modelos experimentales demostraron su eficacia como tratamiento preventivo en comparación con la respuesta al placebo.

La eficacia del topiramato se ha comprobado en todas las clases de migraña episódica, con o sin aura, en la migraña premenstrual y en la migraña crónica, incluso por abuso de medicación (Pascual, 2012; Ferrari et al., 2011; Sarchielli et al., 2012; Lipton et al., 2011).

El topiramato posee múltiples mecanismos de acción que contribuye a su amplio espectro terapéutico:

- Bloquea los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, que reduce la duración y las descargas epileptiformes y la frecuencia y el número de los potenciales de acción generados en cada descarga (De Lorenzo et al., 2000; McLean et al., 2000).
- Refuerza la actividad del GABA, modulando positivamente la acción de éste sobre los receptores GABA e incrementa el flujo de iones Cl⁻ al interior de las neuronas (White et al., 1997).
- Tiene efectos antagonistas sobre los receptores del glutamato cainato/ α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxasole-4-propiónico (AMPA), y no afecta al receptor glutamérgico NMDA, que es modulado por las benzodiazepinas (Biggs et al. 2000; Skaradski et al., 2000). Este bloqueo de excitación ocasiona una reducción de la excitabilidad neural.
- Bloquea los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y reduce la amplitud de las corrientes en los canales de Ca²⁺ tipo L, N y P, respetando los canales de tipo T talámicos (Zhang et al., 2000). Los canales de Ca²⁺ tienen gran importancia al controlar la excitabilidad neural y dendrítica desencadenada por la entrada de Ca²⁺.
- Inhibe las isoenzima II y IV de la anhidrasa carbónica, menos intensa que la inhibición producida por la acetazolamida (Dogson et al., 2000), responsable de algunos de los efectos adversos.

El efecto modulador del topiramato sobre los complejos proteicos se debe a la fosforilación de una o varias subunidades de cada complejo. Se activan o inactivan mediante procesos de fosforilación mediados por proteinquinasas como la proteinquinasa A, proteinquinasa C y otras quinasas activadas por Ca²⁺ y calmodulina. Estas proteinquinasas actúan sobre las secuencias de aminoácidos similares de los diferentes canales de iónicos. Cada secuencia de aminoácidos tiene varios grupos donantes de protones que forman puentes de hidrógeno con los O² del topiramato. El topiramato ejerce su acción sobre los canales defosforilados (Shank et al., 2000).

El topiramato atraviesa la barrera hematoencefálica y penetra en el SNC. En ratas, la concentración cerebral es aproximadamente un tercio de la alcanzada en plasma una hora después de su administración (Shank et al., 2000).

Los efectos adversos, suelen ser transitorios y no afectan a la calidad de vida. La mayoría aparecen a las 6-8 semanas de iniciar el tratamiento y guarda relación con la dosis suministrada. Los efectos adversos más frecuentes conciernen al sistema nervioso e incluyen pérdida de peso/anorexia (Elterman et al., 1999; Ben-Menachem, 1997; Biton et al., 1999; Sachdeo et al., 1999) inestabilidad, nistagmo, temblor, trastornos de la palabra y del lenguaje, somnolencia, lentitud mental y parestesias. Entre los no neurológicos se encuentran los cálculos renales y la anhidrosis.

Toxina botulínica.

Es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} que bloquea reversiblemente la transmisión neuromuscular. Formada por una cadena proteica pesada de 100kDa y una ligera de 50kDa (Bali et al., 2005).

Su uso terapéutico en diversas enfermedades como la parálisis cerebral pediátrica, espasmo hemifacial y distonía cervical ya eran conocidos, pero su uso en el tratamiento de las arrugas en sustitución de la cirugía, (Freitag, 2010) permitió que en 1991 William Binder, observase que las personas con migraña que habían recibido inyecciones de botox (TBA) experimentaban mejoras significativas en los síntomas de cefalea (Troost, 2004).

La inyección intramuscular de toxina botulínica inhibe la liberación de acetilcolina, que produce una denervación química parcial reversible del músculo, reduciendo la actividad muscular durante meses (Marmura et al., 2011). La toxina botulínica bloquea la liberación de neurotransmisores implicados en el dolor, como sustancias P, glutamato y péptido relacionado con el gen de la calcitonina, (Marmura et al. 2011; Silberstein et al 2000; Aurora et al, 2007) que puede ser la clave en la prevención de la migraña crónica. (Blumenfeld et al., 2010) La toxina botulínica inhibe de forma indirecta la sensibilización central (Silberstein et al., 2000; Blumenfeld et al., 2010) incluyendo las neuronas del sistema trigeminovascular.

Parece ser que en estudios comparativos el topiramato y la toxina botulínica mostraron la misma eficacia en la prevención de la migraña crónica. El grupo de la toxina botulínica presentó menos efectos adversos y abandonos (Mathew et al., 2009; Cady et al., 2011).

Se ha observado que el tratamiento con toxina botulínica en pacientes con migraña crónica generada por el abuso de medicamentos, era más eficaz (Freitag, 2010), tal vez debido a la mayor gravedad del problema.

La toxina botulínica tiene mayor eficacia en migraña crónica y probablemente ineficaz ante migrañas episódicas (Naumann et al., 2008). También se ha propuesto su uso como tratamiento estándar en pacientes en situaciones especiales como personal de vuelo o personas mayores que tienen contraindicaciones con algunos fármacos preventivos o les producen efectos adversos.

Genes y migraña.

Se han llevado a cabo diversos estudios de asociación genómicos tipo GWAS (Genome Wide Association Studies) utilizando polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con el objeto de identificar regiones genómicas que estuvieran relacionadas tanto con la migraña, como con los tratamientos y los efectos de los mismos, así como el uso de polimorfismos que han sido publicados por su relación con la migraña (Anttila et al., 2010; Chasman et al., 2011; De Vries et al., 2009; Freilinger et al., 2012; Ligthart et al., 2011).

Otros estudios de asociación se han centrado en estudiar la asociación de la migraña con genes candidatos señalados por su posible implicación en la enfermedad. Tanto estos estudios como los GWAS han permitido identificar genes relacionados con la predisposición a padecer migraña:

El gen MTHFR que codifica la enzima metilentetrahidrofolato reductasa implicada en el metabolismo del ácido fólico y la homocisteína. Su mal funcionamiento produce la elevación de la homocisteinemia que puede tratarse mediante la administración de vitamina B6 y B12, así como el ácido fólico (Johnson et al., 2007).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) implicada en la fisiopatología de la migraña, transforma la angiotensina I en su forma activa angiotensina II. Las variantes genéticas que se asocian con niveles plasmáticos elevados de ECA se han relacionado con la migraña por lo que se estudia la utilidad terapéutica de fármacos inhibidores de esta enzima (Johnson et al., 2007).

Los genes GABRE-GABRA3-GABRQ localizados en el brazo largo del cromosoma X codifican subunidades de los receptores GABA. Las anomalías en estos genes, con la consecuente disfunción del receptor provocan hiper o hipoexcitabilidad, que podrían desencadenar episodios migrañosos.

En el líquido cefalorraquídeo y en el suero de pacientes migrañosos se han encontrado niveles elevados de glutamato, el cual está implicado en la activación trigeminal y la depresión cortical propagada, ambas acciones se relacionan con los ataques de migraña (Di Lorenzo et al., 2012).

Se han estudiado genes relacionado con los niveles de serotonina, ya que los pacientes con migraña tienen bajos niveles basales y su aumento puede ser causa de ataques de migraña.

Alguna hormonas esteroideas también han llamado la atención por sus efectos serotoninérgicos, noradrenérgicos, glutamaérgicos, opiatérgicos o gabaérgicos (Johnson et al., 2007).

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada.

Se han incluido en este estudio 116 pacientes afectados de migraña crónica severa diagnosticados y seleccionados en la Unidad de Cefaleas del Hospital Clínico Universitario de Valladolid tras la obtención de su consentimiento informado. A dichos pacientes se les ha realizado un seguimiento durante 6 meses para evaluar la respuesta al tratamiento.

Recogida de muestras.

La recogida de muestras se realizó entre enero del 2014 y febrero del 2015.

La sangre de los pacientes fue extraída y almacenada congelada en tubos con EDTA, hasta su futura utilización.

Para poder extraer el DNA de las muestras de sangre, previamente se obtuvo un pellet de núcleos mediante hemolizado de la sangre.

Obtención del Pellet.

Se preparan unos tubos de 10 mL, se añade menos del 50% del volumen total de sangre y se completa con una solución de lisis.

Posteriormente se añade 200 μ L de Nonidet P40, se deposita en un agitador, o preferiblemente se voltea hasta que la mezcla esté completamente homogénea.

Seguidamente se centrifuga a 2500 rpm.

Se decanta, dejando un pequeño volumen de sangre en el tubo con el fin de no alterar el pellet.

Por último, se somete los tubos a vortex durante unos segundos para resuspender el pellet y se transfiere al tubo de almacenamiento.

Solución de lisis:

Tris pH=7,6	10mM
Cok	10mM
Cl ₂ Mg	10mM

Extracción de DNA.



Ilustración 1: Kit comercial de extracción, Ultra Clean® Blood DNA Isolation Kit

El kit comercial que se utiliza para la extracción es Ultra Clean® Blood DNA Isolation Kit, (Ilustración 1) que contiene las siguientes soluciones:

La solución G1 tiene un buffer de lisis RBC (Red Blood Cell) que está especialmente formulado para lisar eritrocitos de sangre periférica y tejidos hematopoyéticos como el bazo. Contiene cloruro amónico que lisa los eritrocitos con un mínimo efecto sobre linfocitos.

La solución G2 es requerida para la lisis celular, seguramente contenga algún tipo de detergente como el SDS.

La solución G3 se utiliza para la precipitación de proteínas.

La solución G4 se necesita para hidratar el DNA y poder almacenarlo.

El isopropanol se emplea para precipitar el DNA.

El etanol produce una mayor purificación de los ácidos nucleicos eliminando la sal residual.

Procedimiento:

Preparar un Eppendorf por muestra, rotular cada uno con su número de muestra. Añadir 900µL de solución G1 en cada Eppendorf y echar 300µL de sangre de los tubos donde estaba el pellet previamente preparado.

Posteriormente invertir 2 veces cada Eppendorf y dejarlo incubando 5 minutos a temperatura ambiente, acto seguido, centrifugar 30 segundos a 13000g.

Decantar los Eppendorf tirando el sobrenadante, haciéndolo de una sola vez para evitar que se resuspenda el pellet.

Resuspender el pellet completamente, para ello se utiliza el vortex, aunque se consigue mejor si se aplica unos golpes al fondo del Eppendorf con el dedo hasta ver que se ha despegado del fondo.

Echar 300 μ L de la solución G2, mirando previamente que no se ha cristalizado, si se hubiese cristalizado, calentar G2 durante 5 minutos a 55-65°C.

Pipetear repetidamente con una micropipeta, para disgregar el pellet formado, una vez hecho, añadir 100 μ L de solución G3 y aplicar un vortex durante 15 segundos. A continuación centrifugar 3 minutos a 13000g.

En este paso hay que coger nuevos tubos cónicos de 2.5 mL donde se almacenará el DNA y rotularlos con el número de muestra. Recoger los Eppendorf que se habían centrifugado y transferir el sobrenadante con una pipeta sin apurar demasiado, para evitar coger impurezas.

Echar 300 μ L de isopropanol, voltearlo 15 veces e incubarlo a temperatura ambiente durante 3 minutos, acto seguido, centrifugar durante 1 minuto a 13000g.

Descartar el sobrenadante, como se ha indicado, y secar sobre un papel absorbente.

Con el fin de eliminar las sales restantes, añadir 300 μ L de etanol al 70%, invertir 5 veces y centrifugar 30 segundos a 13000g a temperatura ambiente.

Decantar de nuevo, con cuidado de no resuspender el pellet y apoyarlo sobre un papel absorbente. Dejar secar con el tapón abierto durante 24 horas o hasta completar la evaporación.

Añadir 300 μ L de solución G4, colocar cada Eppendorf en una gradilla preparada para el baño, introducirlo a 65°C hasta que se resuspenda el pellet, no más de 40 minutos.

El DNA ya está extraído, ahora se congela hasta su utilización.

Cuantificación del DNA por NanoDrop.



Medir la concentración de DNA en la solución obtenida y comprobar la calidad de la muestra utilizando el NanoDrop (Ilustración 2).

Primero se retira la espumilla de la punta de cuarzo del pedestal y se limpia el NanoDrop con 5µL de agua Mili-Q, durante 3 minutos, después añadir 1 µL de solución G4 del kit de extracción que se mide y se utiliza como blanco.

Limpia nuevamente con 2 µL de agua Mili-Q y dejarlo 2 minutos, después añadir 1µL de la muestra y medirlo.

Ilustración 2: NanoDrop

Con el fin de conocer la concentración y la calidad de la muestra, medir su absorbancia a 260 y 280nm. La absorbancia a 260nm mide la concentración de DNA y la de 280nm la de proteínas. El valor del cociente de absorbancias 260/280 debe ser >0.8 (Ilustración 3). La concentración de DNA se obtiene expresada en ng/µL. Limpiar entre muestra y muestra con agua Mili-Q, añadir 2 µL y dejarlo 2 minutos, al finalizar se añade también 5 µL y que permanezca 3 minutos, para limpiar el NanoDrop.

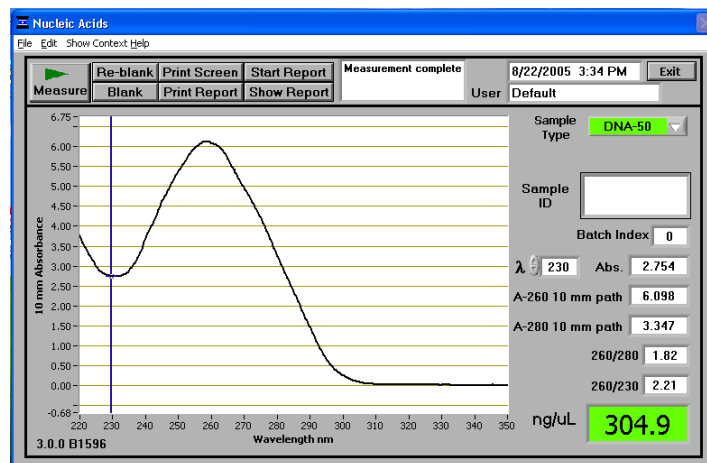


Ilustración 3: Medida de DNA por NanoDrop

Una vez determinada la cantidad en ng/µL se debe llevar a la concentración que se desea utilizar, que es 3,5 ng/µL, para ello se utiliza la fórmula, concentración inicial por volumen inicial, es igual a la concentración final por volumen final ($C_i \times V_i = C_f \times V_f$), donde nuestra concentración final es 3,5ng/µL y el volumen final que se quiere es 200µL, por lo que teniendo el resultado de la concentración inicial por el NanoDrop, sólo se debe hallar el volumen inicial que se necesita introducir de nuestro stock y completarlo hasta 200 µL con solución G4.

Genotipado con sondas KASP.

Esta técnica permite genotipar polimorfismos que difieren tan solo en un nucleótido (SNP), tiene una precisión mayor del 99,8%, y según el manual del fabricante bastan entre 0,1 y 10ng de DNA genómico.

La técnica se basa en una PCR con la utilización simultánea de sendos cebadores específicos *forward*, en donde cada uno difiere en solo un nucleótido y reconoce uno de los alelos. Cada uno de ellos contiene en el extremo 5' una secuencia idéntica a una sonda, la cual está marcada con el fluorocromo HEX o con el FAM. El cebador *reverse* es universal. Las sondas marcadas están incluidas en la master mix y van unidas a un quencher para evitar que emita fluorescencia si no está unido a la secuencia específica (Ilustración 4).

En el primer ciclo, se desnaturaliza la doble hebra de DNA a 94°C y los cebadores se unen a la secuencia complementaria de DNA genómico a 65°C, el cebador *forward* específico a una hebra y el cebador *reverse* universal a la otra. Una vez unidos la polimerasa elongará la cadena a partir de la hebra molde (Ilustración 5).

En el segundo ciclo se desnaturaliza la doble hebra de DNA a 94°C, y vuelve a unirse los cebadores a 65°C, en donde el cebador *reverse* universal se unirá al fragmento elongado por el primer *forward* específico del primer ciclo. La hebra amplificada por el cebador *reverse* contiene en su extremo 3' la secuencia complementaria de la sonda marcada (Ilustración 6).

En el tercer ciclo, se desnaturaliza de nuevo la doble hebra de DNA a 94°C y a 65°C, la sonda marcada liberada del quencher, se une a su secuencia complementaria que ya se ha señalado (Ilustración 7).

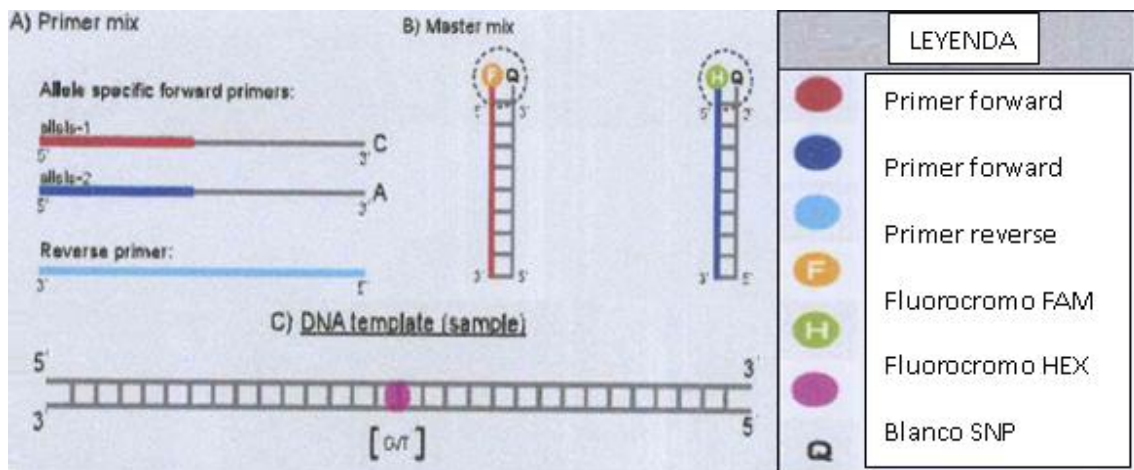


Ilustración 4: Cebadores, sondas y DNA de muestra

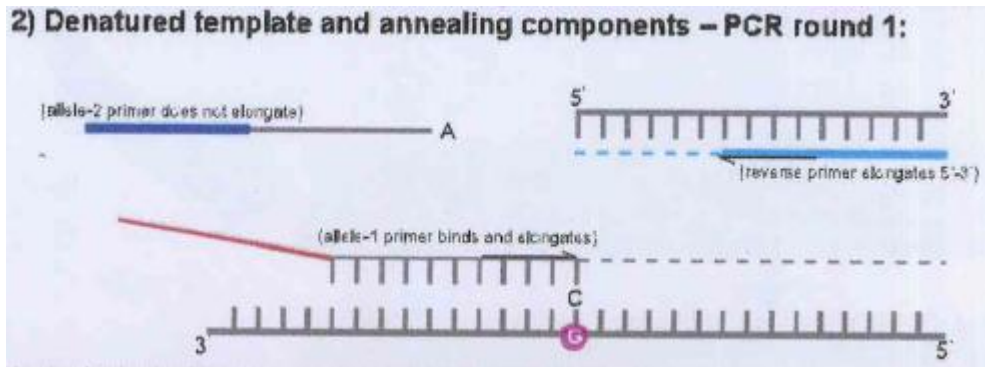


Ilustración 5: Primera ciclo de PCR con sondas KASP

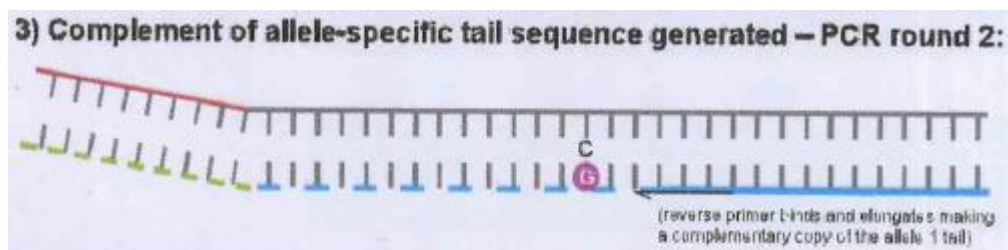


Ilustración 6: Segundo ciclo de PCR

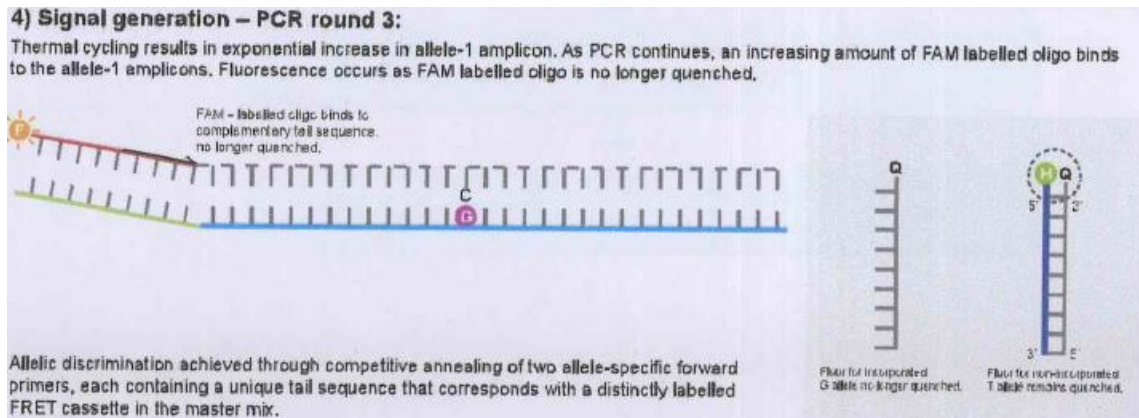


Ilustración 7: Tercer ciclo de PCR

En los ciclos siguientes se amplificará el fragmento unido con el fluorocromo, aumentando la fluorescencia y de esta manera, determinando el polimorfismo.

Se debe analizar los 28 polimorfismos en cada paciente.

Para ello se rotula, hojas preparadas para indicar qué contiene cada pocillo de las placas blancas “FrameStar® 480/96 for Roche Lightcycler 480” de 96 pocillos, donde se pone la muestra y el polimorfismo estudiado (Ilustración 8).

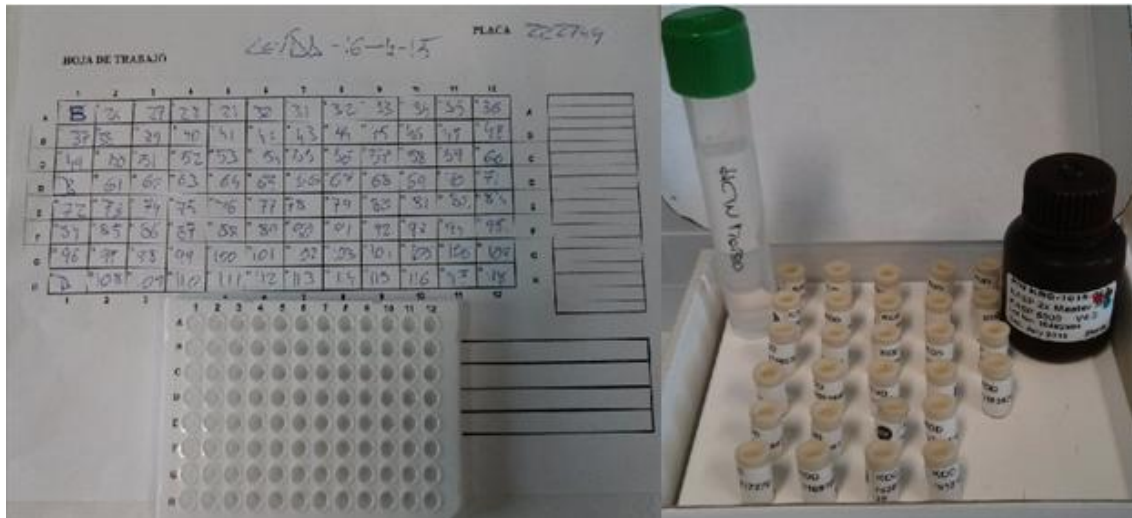


Ilustración 8: Imagen izquierda, ficha cumplimentada con el número de muestra por pocillo, el polimorfismo utilizado y la fecha de visualización de los resultados. Imagen derecha, elementos para preparar la mix de trabajo: agua libre de nucleasas, polimorfismos estudiados y master mix del kit comercial.

Preparación de la mix de trabajo (Ilustración 8) por pocillo:

Mix del kit comercial (dNTPs, polimerasa y sondas)	4uL
Agua	1uL
Mezcla de cebadores	0.11uL

(se recomienda preparar un pocillo más por cada diez).

Vortexar la mix.

Se añaden los 5,11 μ L por pocillo de la mix de trabajo y se añade 1 μ L de DNA previamente vortexado de las muestras a estudiar en el pocillo correspondiente.

Mezclar bien con la micropipeta.

Precintar la placa, con un pegatina transparente de Roche, "LightCycler[®] 480 Sealing Foil". Por último, centrifugar las placas, dándole tan solo un spin.

Realizar la reacción de PCR específica usando el termociclador según el protocolo siguiente (ilustración 9):

94°C, 15 minutos

94°C, 20 segundos y 65°C, 1 minuto, 10 veces

94°C, 20 segundos y 57°C, 1 minuto, 40 veces

4°C, todo el tiempo que esté hasta que se recojan las muestras

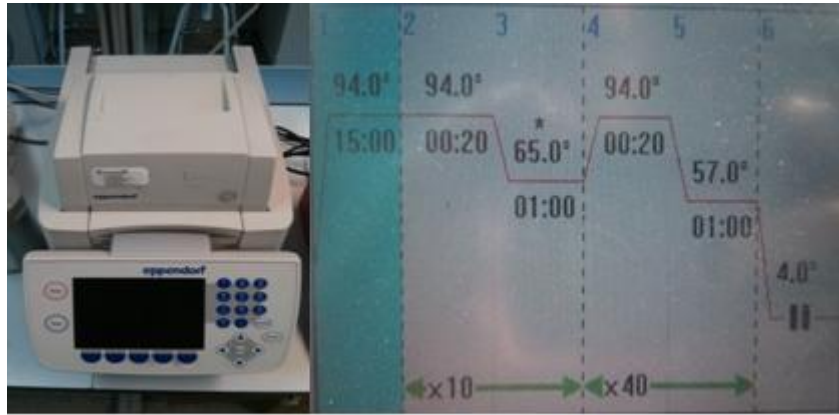


Ilustración 9: Imagen izquierda, termociclador utilizado. Imagen derecha, ciclo del termociclador empleado.

Realizada la PCR, se conserva la placa a -20°C overnight, ya que se ha comprobado que se obtienen mejores lecturas si se realiza de esta forma, si no fuese así, se podría realizar la reacción de PCR y el análisis en el mismo aparato (Ilustración 10).



Ilustración 10: Termociclador LightCycler 480®

La lectura de los resultados se realizó en un termociclador LightCycler 480®, según el siguiente protocolo:

Modo de adquisición:	sencillo
Rampa:	4,4°C/s
Formato de detección:	Dual Hydrolysis Probe/ UPL Probe
Modo de análisis:	Cuantificación
Lectura:	Mantener 20 segundos a 37°C y a continuación medir la absorbancia de:
	FAM 465-510nm
	HEX 533-580nm

Cuando introducimos la placa en el termociclador LightCycler 480®, seleccionamos los pocillos a analizar y el polimorfismo a estudiar.

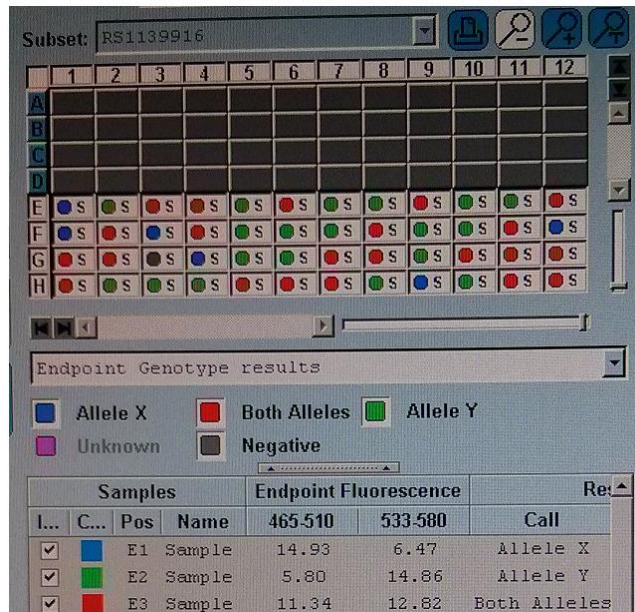
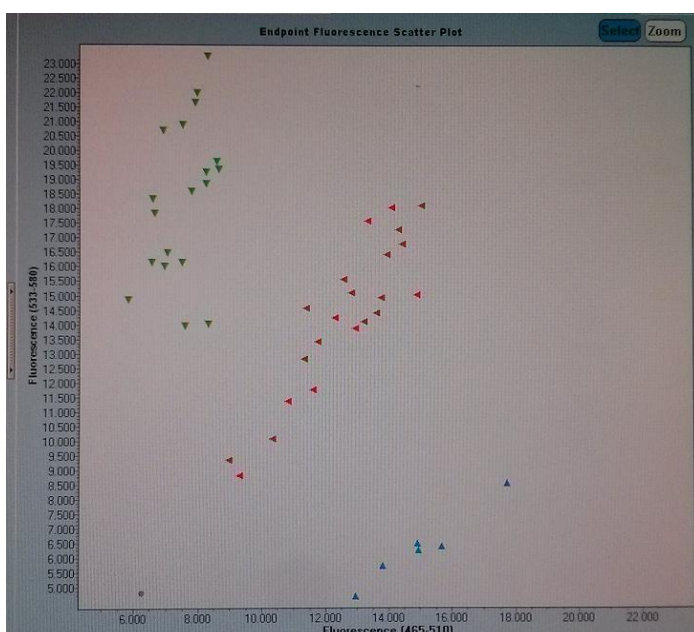


Ilustración 11: Asignación de muestras como FAM, HEX, BOTH, desconocido o control negativo en cada pocillo de la placa

La medida de la absorbancia asignará los alelos (en homo o heterocigosis) en función de la fluorescencia emitida por FAM y/o HEX (Ilustración 11).

Una vez hecho esto, el programa elabora una gráfica, donde en el eje de abscisas colocará las muestras que sean FAM, donde los dos cromosomas homólogos contengan la misma secuencia, en el eje de ordenadas colocará las muestras que sean HEX, que cada muestra tendrá los dos cromosomas homólogos idénticos y que varíen con respecto a las muestras que ha establecido como FAM en un nucleótido y por último colocará en la recta bisectriz entre la ordenada y la abscisa, BOTH, que tendrá un cromosoma con un nucleótido y el homólogo con otro distinto.



La asignación de las muestras a los diversos genotipos de cada polimorfismo, ha de ser revisada por el investigador.

Se introducen controles negativos, para identificar la fluorescencia de fondo.

Ilustración 12: gráfica representando las muestras según su fluorescencia

Se escogieron 28 polimorfismos de entre los muchos que existen para este trastorno. Se eligieron estos, por estar relacionados tanto con los mecanismos de acción de los tratamientos como con la migraña.

Dichos polimorfismos pertenecen a genes relacionados con aminoácidos como el glutamato, neurotransmisores como el GABA, la dopamina o la serotonina, sistemas enzimáticos y canales dependientes de voltaje.

A continuación se indica, el polimorfismo estudiado, el cambio de secuencia del DNA, el gen en el que se encuentra, su secuencia de referencia (NM), si provoca cambios en la proteína y su secuencia de referencia (NP) y la posición en el cromosoma.

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
MEF2D	rs1050316	NM_001271629.1:c.*2734C>A,	-	608320	15q26.3
TGFBR2	rs7640543			190182	3p24.1
LRP1	rs11172113	NM_002332.2:c.67+4469T>C		190182	3p24.1
TRPM8	rs10166942	NM_024080.4:c.-990T>C		606678	2q37.1
MTDH (LOC101927066)	rs1835740			610323	8q22.1
EAAT2 (SLC1A2)	rs4354668	NM_001195728.2:c.-130+507A>C		600300	11p13
GRIK3	rs6691840	NM_000831.3:c.928T>C	NP_000822.2:p.Ser310Ala	138243	1p34.3

Tabla 1: Genes relacionados con la homeostasis del Glutamato.

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
CALCA	rs378179 rs145837941	NC_000021.8:g.22052312C>T NM_001033952.2:c.197T>C,	NP_001029124.1:p.Leu66Pro	114130	11p15.2

Tabla 2: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) Nomenclatura HuGo

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
CLEC7A	rs16910526 rs16910631	NM_022570.4:c.576T>G NM_022570.4:c.104-811G>A	<u>NP_072092.2:p.Tyr192Ter</u>	<u>606264</u>	<u>12p13.2</u>

Tabla 3: (CTL/CTLD) superfamilia

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
GABRE	rs1139916	NM_004961.3:c.304T>G,	NP_004952.2:p.Ser102Ala	300093	Xq28
GABRQ	rs3810651	NM_018558.3:c.1432A	NP_061028.3:p.Ile478Phe	300349	Xq28
GABRA3	rs6627221	NM_000808.3:c.551+8376A>G,		305660	Xq28

Tabla 4: Sistema receptor GABA

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
SCN9A	rs6746030	NM_002977.2:c.3448C	NP_002968.1:p.Arg1150,	603415	2q24.3
KCNS1	rs734784	NM_002251.3:c.1465A>G	NP_002242.2:p.Ile489Val	602905	20q13.12
P2RX7	rs2230912	NM_002562.5:c.1379A>G	NP_002553.3:p.Gln460Arg	602566	12q24.31
	rs1718119	NM_002562.5:c.1042G>A	NP_002553.3:p.Ala348Thr,		

Tabla 5: Canales dependientes de voltaje

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
DRD2(ANKK1)	rs1800497	NM_178510.1:c.2137G>A	NP_848605.1:p.Glu713Lys	608774	11q23.2

Tabla 6: Receptores dopamina

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
HTR2C	rs3813929	NM_000868.2:c.-759C>T		312861	Xq23

Tabla 7: Sistema serotoninérgico

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
TRPV1	rs222749	NM_018727.5:c.271C>T	NP_061197.4:p.Pro91Ser NP_061197.4:p.Met315Ile	602076	17p13.2
	rs222747	NM_018727.5:c.945G>C			
	rs222741	NM_080704.3:c.-34+2841C>T			
TRPV3	rs7217270	NM_001258205.1:c.2085+395T>C		607066	17p13.2

Tabla 8: Familia TRP

GEN	SNP	NM	NP	MIM	POSICIÓN
WFS1	rs734312	NM_001145853.1:c.1832G>A	NP_001139325.1:p.Arg611His	606201	4p16.1

Tabla 9: Otros Genes estudiados

RESULTADOS

De los 116 pacientes incluidos inicialmente en el estudio, 13 lo abandonaron.

Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se realizó el análisis de los 28 polimorfismos escogidos y se comprobó si se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). Todos excepto 3 se encontraban en equilibrio.

Para ello se genotiparon 116 pacientes con la técnica de sondas específicas KASP para cada polimorfismo y se calcularon las frecuencias génicas y genotípicas. Se compararon los observados con los esperados y se hizo una Chi-cuadrado para comprobar si se ajustaban al equilibrio de H-W.

Tres polimorfismos no se encontraban en equilibrio: rs3813929_1732, rs2078170 y rs222749, el primero en el gen HTR2C, los otros dos, en el gen CLEC7A.

El gen HTR2C, codifica para 7 proteínas transmembranas asociadas a receptores de proteínas G. Se localiza en el cromosoma Xq24 y consta de 7 exones.

La proteína codificada responde a la señalización a través de neurotransmisores de serotonina. El mRNA de este gen es objeto de múltiples eventos de modificación, donde los residuos de adenosina codificados por el genoma son convertidos a inosinas. Los eventos de formación del RNA alteran la estructura del segundo bucle intracelular, generando de este modo formas de proteína alternas con disminución de la capacidad para interactuar con las proteínas G. Ocurren de forma natural variaciones en el promotor y en regiones 5' codificantes y no codificantes de este gen, que pueden mostrar asociación estadísticamente significativa con la enfermedad mental y trastornos de conducta. Se producen distintas variantes de transcripción debido al splicing alternativo.

El gen CLEC7A, conocido por otros nombre como BGR; CANDF4; DECTIN1; CLECSF12, se localiza en 12p13.2 y consta de 9 exones.

Codifica una glicoproteína que es un receptor de membrana tipo II con un dominio extracelular tipo C-lectina y un dominio citoplasmático con motivo de activación, basado en un inmunoreceptor de tirosina.

Su función es el reconocimiento de patrones, reconoce una variedad de enlaces de glucanos con enlaces beta 1,6 y beta 1,3 que se encuentran en hongos y plantas, está relacionado con el sistema inmune innato.

Respuesta al topiramato.

De los 103 pacientes que participaron en el estudio, 22 respondieron al topiramato y 81 no. Se compararon mediante la prueba del Chi-cuadrado la distribución genotípica, la frecuencia alélica, y las hipótesis de dominancia de uno u otro alelos entre los grupos de pacientes respondedores y no respondedores al topiramato.

Todos los resultados se muestran en el Anexo Datos, incorporados en el CD.

Se encontraron diferencias significativas en las siguientes comparaciones:

GEN	POLIMORFISMO	COMPARACIÓN	P VALOR
TRPM8	rs10166942	Frecuencia Alélica	0,048
		Hipótesis de dominancia de C	0,0345
TGFB2	rs7640543	Distribución genotípica	0,0493
		Frecuencia Alélica	0,0191
CLEC7A INTRÓN	rs16910526	Distribución genotípica	0,0418
		Frecuencia Alélica	0,0158
		Hipótesis de dominancia de G	0,0495
MTDH	rs1835740	Frecuencia Alélica	0,0208
CALCA INTRÓN	rs3781719	Distribución genotípica	0,0394

Tabla 10: Polimorfismos significativos en pacientes tratados con topiramato. No se muestran los polimorfismos, ni las comparaciones no significativas.

El polimorfismo rs10166942 localizado en el gen TRPM8 mostró diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a las frecuencias alélicas con un valor P de 0,048; donde en el grupo de no respondedores, el alelo T, representa el 80,86%, mientras que en el grupo de respondedores el alelo T representa el 66,6%. También hubo diferencias significativas en la hipótesis de dominancia de C con un valor P de 0,0345.

Conocido también como TRPP8 o LTRPC6, está formado por 26 exones, localizado en la región 2q37.1.

Codifica para un receptor potencial de cationes transitorio, miembro 8 de la subfamilia M. Es un sensor de frío y dolor inducido por frío. Se expresa principalmente en neuronas sensoriales y en la raíz dorsal ganglionar. TRPM8 se investiga como objetivo en dolores neuropáticos en modelos animales. Su inclusión en el estudio se debe al hecho de que la migraña y el dolor neuropático comparten algunas características.

El polimorfismo rs7640543 localizado en el gen TGFB2 mostró diferencias significativas entre los dos grupos, en sus distribuciones genotípicas con un valor P de 0,0493; en sus frecuencias alélicas con un valor P de 0,0191, donde en el grupo de no respondedores, el alelo A, representa el 39,5% mientras que en el grupo de respondedores el alelo A, representa el 20,45%. También hubo diferencias significativas en las hipótesis de dominancia de G con un valor P de 0,0345.

Conocido con otros nombres como AAT3; FAA3; LDS2; MFS2; RIIC; LDS1B; LDS2B; TAAD2; TGFR-2; TGFbeta-RII, está formado por 9 exones y se localiza en la región 3p22.

Codifica para una proteína de 70/80kDa llamada factor de crecimiento transformador del receptor beta-II. Es miembro de la familia de protein-quinasas Serina/Treonina y de la subfamilia de receptores TGFB. Codifica una proteína transmembrana que tiene un dominio de protein-quinasa, forma un complejo heterodimérico con otro receptor proteico y se une TGF-beta. Este complejo receptor / ligando fosforila proteínas, que luego entran en el núcleo y regulan la transcripción de un subconjunto de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular así como con la producción de la matriz extracelular.

Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de Marfan, síndrome de aneurisma aórtico Loeys-Deitz, y el desarrollo de diversos tipos de tumores. Se han caracterizado variantes por splicing alternativo que codifican diferentes isoformas.

El polimorfismo rs16910526 localizado en el gen CLEC7A mostró diferencias significativas entre los dos grupos, en sus distribuciones genotípicas con un valor P de 0,048, en sus frecuencias alélicas con un valor P de 0,0158; donde en el grupo de no respondedores, el alelo G, representa el 75,94%; mientras que en el grupo de respondedores el alelo G, representa el 57,14%. También hubo diferencias significativas en la hipótesis de dominancia de G con un valor P de 0,0495.

El polimorfismo rs1835740 localizado en el gen MTDH, mostró diferencias significativas entre los dos grupos, en sus frecuencias alélicas con un valor P de 0,0208; donde en el grupo de no respondedores, el alelo C representa el 80,24%, mientras que en el grupo de respondedores el alelo C, representa el 63,63%.

Conocido también como 3D3; AEG1; AEG-1; LYRIC; LYRIC/3D3, localizado en la región 8q22.1, consta de 13 exones.

Codifica para la proteína metaderina, sobreexpresada en el cáncer de mama y en el proceso metastásico. La expresión de MTDH, regula indirectamente la expresión del gen SLC1A2 transportador de glutamato (también conocido como EAAT2 o GLT-1), que codifica un importante transportador de glutamato en el cerebro. Esta observación es coherente con la teoría de que el aumento de la liberación de glutamato o su consumo reducido, aumenta el riesgo de ataques de migraña

Las diferencias en la distribución genotípica del polimorfismo rs3781719 localizado en el gen CALCA, mostró diferencias significativas entre los dos grupos, con un valor P de 0,0394.

Conocido por otros nombres CT; KC; CGRP; CALC1; CGRP1; CGRP-I, se localiza en la región 11p15.2 y consta de 6 exones.

Se ha asociado la migraña con un aumento de los niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en el plasma. Siendo CGRP uno de los mediadores de la inflamación neurogénica, por lo que sugiere tener

un papel importante en la fisiopatología de la migraña. Los polimorfismos del gen CALCA se han relacionado con la enfermedad de Parkinson, cáncer de ovario y la hipertensión primaria. Aparentemente polimorfismos intrónicos no funcionales son capaces de alterar el procesamiento normal del RNA o la introducción de sitios de splicing en la transcripción. Una delección en el primer intrón de 16pb del gen CALCA es un posible sitio de unión de un factor de transcripción que se expresa fuertemente en células derivadas de la cresta neural AP-2. Esta delección también elimina un sitio potenciador de splicing intrónico (ISE) promoviendo la omisión del exón.

Codifica para las siguientes hormonas peptídicas: calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y catacalcina. Todas ellas son isoformas que se obtienen del mismo gen por splicing alternativo del RNA y son específicas de tejido. La calcitonina está involucrada en la regulación del calcio y actúa como regulador del metabolismo del fósforo. Los distintos péptidos formados de calcitonina están relacionados con distintas funciones actuando como vasodilatador o como péptido antimicrobiano, la catacalcina es una hormona polipeptídica que se produce en las células parafoliculares del tiroides. La catacalcina transforma la procalcitonina, en calcitonina. Hay múltiples variantes transcritas codificadas por diferentes isoformas que han sido encontradas por este gen.

Respuesta a toxina botulínica (Botox®).

En los pacientes que no respondieron al tratamiento con topiramato, se realizó un segundo estudio con el fin de analizar la correlación entre la presencia de las variantes genéticas estudiadas y la respuesta a toxina botulínica. De los 81 pacientes que no respondieron al tratamiento, 20 de ellos se encuentra aún en seguimiento, por lo que no se dispone de resultados definitivos.

En los 61 pacientes restantes se compararon mediante la prueba del Chi-cuadrado la distribución genotípica, la frecuencia alélica, y las hipótesis de dominancia de uno u otro alelos entre los grupos de pacientes respondedores y no respondedores al Botox®.

Todos los resultados se muestran en el Anexo Datos, incorporados en el CD.

En este segundo estudio, resultaron significativas las siguientes comparaciones:

GEN	POLIMORFISMO	COMPARACIÓN	P VALOR
CLEC7A VARIANTE INTRONICA	rs2078178	Frecuencia Alélica	0,0075
		Hipótesis de dominancia de A	0,0214
CLEC7A VARIANTE INTRÓNICA	rs16910631	Distribución genotípica	0,0129
		Frecuencia Alélica	0,0029
		Hipótesis de dominancia de T	0,0231

Tabla 11: Polimorfismos significativos en pacientes tratados con toxina botulínica. No se muestran los polimorfismos, ni las comparaciones no significativas.

En el gen CLEC7A dos polimorfismos mostraron diferencias significativas: el polimorfismo rs2078178 mostró diferencias significativas tanto en su distribución genotípica ($P=0.026$), frecuencias alélicas ($P=0.0075$), donde el alelo A es más frecuente (56.25%) en no respondedores que en respondedores (20.21%) e hipótesis de dominancia del alelo A ($P=0.0214$).

Con respecto al polimorfismo rs16910631, las diferencias obtuvieron un valor de $P=0.0129$ para la distribución genotípica, $P=0.0029$ para las frecuencias alélicas (el alelo C supone el 93.42% en no respondedores por un 73.08 en respondedores) y $P=0.0231$ para la hipótesis de dominancia de T.

DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio es identificar perfiles genéticos que orienten la terapia óptima desde el momento del diagnóstico. De este modo, se podrá determinar con una simple extracción de sangre qué tratamiento es el más adecuado para un determinado paciente. Ésta es la medicina del futuro, una medicina personalizada, más específica y efectiva. Actualmente es necesario utilizar el tanteo terapéutico basado en la eficiencia estadística, para hacer el perfil genético y recopilar resultados, tratar a los pacientes con topiramato en primera instancia y administrar Botox[®] secuencialmente a los no respondedores.

Actualmente, los pacientes migrañosos utilizan estrategias terapéuticas de primera línea y en función de la respuesta se van ensayando otras terapias hasta dar con la adecuada

Las ventajas de la medicina personalizada, no es sólo la reducción del tiempo medio en identificar el tratamiento adecuado a cada paciente, mejorando su nivel de vida y reduciendo los días de incapacidad, sino que al mismo tiempo, evitamos exponerle a terapias ineficaces pero no desprovistas de efectos indeseables.

Genotipado.

La técnica de genotipado con sondas KASP, tiene una precisión basada en ensayos independientes del 99,8%; elimina la necesidad de sondas doblemente marcadas que son más costosas, necesita una cantidad ínfima de muestra (0,1 – 10ng), tiene una especificidad muy alta, lo que nos permite el estudio de SNP.

Esta técnica, nos permite analizar varias veces la placa y al leerlo en el termociclador LightCycler 480[®] podemos realizar una base de datos en un sistema informatizado, con la ventaja de poder reproducir los resultados en el momento deseado y hasta modificarlos si es necesario pudiendo elaborar unos nuevos datos.

Para comprobar su eficiencia, se han realizado repeticiones de todas las sondas y se ha determinado el mismo resultado, con algunas excepciones, debidas a falta de fluorescencia en esa muestra.

Con esta técnica en nuestro estudio se pretende realizar un perfil genético que oriente desde un primer momento, qué tratamiento es más adecuado (topiramato o toxina botulínica) para tratar la migraña crónica en cada paciente.

Equilibrio Hardy-Weinberg.

La población estudiada estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los polimorfismos estudiados, excepto para rs3813929_1732, rs2078170 y rs222749.

Este desequilibrio puede explicarse, o bien por el reducido tamaño de la muestra o por la existencia de un sesgo de selección. Esta última situación se produce cuando existe una relación estrecha entre el criterio de selección, en nuestro caso la migraña crónica severa y el polimorfismo.

Respuesta al topiramato.

El polimorfismo rs10166942 perteneciente al gen TRPM8 mostró diferencias significativas entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores en lo que respecta a la frecuencia alélica. En el grupo de respondedores, el alelo C es más frecuente (33,4%) con respecto al grupo de no respondedores (19,14%). Además las diferencias también fueron significativas en la hipótesis de dominancia del alelo C; es decir el efecto existe tanto en homo como en heterocigosis.

El polimorfismo rs10166942 perteneciente al gen TGFBR2 mostró diferencias significativas entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores en lo que respecta a la frecuencia alélica. En el grupo de respondedores, el alelo G es más frecuente (33,4%) con respecto al del grupo de no respondedores (19,14%).

El polimorfismo rs2078178 perteneciente al gen CLEC7A mostró diferencias significativas entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores en lo que respecta a la frecuencia alélica. En el grupo de respondedores, el alelo A es más frecuente (42,86%) con respecto al del grupo de no respondedores (24,06%). Además las diferencias también fueron significativas en la hipótesis de dominancia del alelo G; es decir el efecto existe tanto en homo como en heterocigosis.

No se conoce relación entre el gen CLEC7A y la migraña o la respuesta al tratamiento. Los polimorfismos estudiados fueron incluidos exclusivamente porque estaban disponibles y nos permitían estudiar la posible relación de la región genómica 12p13.2; p13.31

Sin embargo se ha encontrado evidencias significativas de la migraña con aura con la región 12p13. Esta región contiene 3 genes expresados en cerebro que codifican subunidades de canales de potasio dependientes de voltaje. Esos genes no muestran asociación con la migraña con aura en pacientes control, sin embargo podría haber relación en pacientes con migraña severa que tenga una frecuencia alélica menor del 10% (Tikka-Kleemola et al., 2010).

El polimorfismo rs1835740 perteneciente al gen MTDH mostró diferencias significativas entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores

con respecto a la frecuencia alélica. En el grupo de respondedores, el alelo T es más frecuente (34,37%) con respecto al grupo de no respondedores (24,06%).

El polimorfismo rs3781719 perteneciente al gen CALCA Intrón, mostró diferencias significativas en la distribución genotípica, porque el grupo de respondedores no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg por existir un número elevado de heterocigotos probablemente debido al pequeño número muestral.

Hasta donde nosotros conocemos ningún estudio anterior ha abordado la relación entre las variantes y genes incluidos en este estudio y la respuesta al topiramato.

Respuesta a la toxina botulínica (Botox®).

El polimorfismo rs2078178 perteneciente al gen CLEC7A mostró diferencias significativas entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores con respecto a la frecuencia alélica. En el grupo de respondedores, el alelo G es más frecuente (79,79%) con respecto al grupo de no respondedores (43,75%). Además las diferencias también fueron significativas en la hipótesis de dominancia del alelo G; es decir el efecto existe tanto en homo como en heterocigosis.

En el polimorfismo rs16910631 perteneciente al gen CLEC7A mostró diferencias significativas entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores con respecto a la frecuencia alélica. En el grupo de respondedores, el alelo T es más frecuente (26,92%) con respecto al grupo de no respondedores (6,38%). Además las diferencias también fueron significativas en la hipótesis de dominancia del alelo T; es decir el efecto existe tanto en homo como en heterocigosis.

Hasta donde nosotros conocemos ningún estudio anterior ha abordado la relación entre las variantes y genes incluidos en este estudio y la respuesta a la toxina botulínica.

CONCLUSIONES

1. La técnica empleada ha demostrado cumplir los criterios de sensibilidad y especificidad para realizar este estudio.
2. Las variantes rs10166942; rs7640543; rs1835740 y rs3781719 que corresponden respectivamente a los genes TRPM8, TGFBR2, MTDH Y CALCA INTRON, han mostrados correlación exclusivamente con respuesta al topiramato.
3. Las variante rs2078178 que corresponde al gen CLEC7A ha mostrado correlación exclusivamente con respuesta a la toxina botulínica.
4. La región 12p13.2; p13.31 en la que se localizan el polimorfismo rs16910526 del gen CLEC7A estudiado, ha mostrado asociación tanto a la respuesta al topiramato como a la toxina botulínica.

BIBLIOGRAFÍA

Anttila V, Stefansson H, Kallela M, Todt U, Terwindt GM, Calafato MS, Nyholt DR, Dimas AS, Freilinger T, Muller-Myhsok B, Artto V, Inouye M, Alakurtti K, Kaunisto MA, Hamalainen E, De VB, Stam AH, Weller CM, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Goebel I, Borck G, Gobel H, Steinberg S, Wolf C, Bjornsson A, Gudmundsson G, Kirchmann M, Hauge A, Werge T. et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet.* 2010;15:869–873. doi: 10.1038/ng.652

Aurora SK, Gawel M, Brandes JL, Pokta S, Vandenburg AM; Botox North American Episodic Migraine Study Group. Botulinum toxin type a prophylactic treatment of episodic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study. *Headache* 2007; 47: 486-99.

Aurora SK, Kulthia A, Barrodale PM. Mechanism of chronic migraine. *Curr Pain Headachr Rep* 2011; 15: 57-63.

Atlas of headache disorders and resources in the world 2011. A collaborative Project of World Health Organization and Liftin The Burden. En:http://www.who.int/mental_health/management/atlas_headache_disorders/en/index.html;consultado 14/05/2013

Bali J, Thakur R. Poison as cure: a clinical review of botulinum toxin as an invaluable drug. *J Venom Anim Toxin Incl Trop Dis* 2005; 11: 412-21.

Ben-Menachem E, and the Topiramate YTCE Study Group. A double-blind trial of topiramate in patients with generalised tonic-clonic seizures of non-focal origin. *Epilepsia* 1997;38 (Suppl 3): S60.

Biggs JW, Sombati S, Delorenzo RJ, Coulter DA. Cellular actions of topiramate: bookcase of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl 1): S10-6.

Biton V, Montouris GD, Ritter F, Riviello JJ, Reife R, Lim P, Pledger G, and the Topiramate YTC Study Group. A randomized placebo-controlled study of topiramate in primary generalized tonic-clonic seizures. *Neurology* 1999; 52: 1330-7.

Blumenfeld AM, Bloudek LM, Becker WJ, et al. Patterns of use and reason for discontinuation of prophylactic medications for episodic migraine and chronic migraine: results from the Second International Burden of Migraine Study (IBMS-II). *Headache* 2013; 53: 644-55.

Blumenfeld AM, Silberstein SD, Dodick DW, Aurora SK, Turkel CC, Binder WJ. Method of injection of onabotulinumtoxinA for chronic migraine: a safe, well-tolerated, and effective treatment paradigm based on the PREEMPT clinical program. *Headache* 2010; 50: 1406-18.

Cady RK, Schreiber CP, Porter JA, Blumenfeld AM, Farmer KU. A multi-center double-blind pilot comparison of onabotulinumtoxinA and topiramate for the prophylactic treatment of chronic migraine. *Headache* 2011; 51: 21-32.

Catterall WA (1998). Structure and function of neural Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24: 307-323.

Chasman DI, Schürks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer LJ, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM, 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 RY, Kurth T. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet* 2011; 43: 695–698.

De Fusco M, Marconi R, Silvestri L et al. (2003). Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na^{+}/K^{+} pump α_2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 33: 192-196.

De Lorenzo RJ, Sombati S, Coulter DA. Effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous recurrent seizure discharges in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl 1) S40-4.

De Vries B, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 2009; 126: 115–132.

- Di Lorenzo C, Grieco GS, Santorelli FM. Migraine headache: a review of the molecular genetics of a common disorder. *J Headache Pain*.2012; 13(7): 571-80.
- Diez MA, Leston J, Chaná P, Barrimentos N. Toxina botulínica en el tratamiento de la migraña. *Revista Neurológica Argentina* 2003;28: 205-8.
- Dodick DW, Turkel GC, DeGryse RE, Aurora SK, Silberstein SD, Lipton RB, et al.; PREEMPT Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: pooled results from the double-blind, randomized, placebo- controlled phase of the PREEMPT clinical program. *Headache* 2010; 50: 921-36.
- Dogson SJ, Shank RP, Maryanoff BE. Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isozymes. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl 1): S35-9.
- Elterman RD, Glauser TA, Wyllie E, Reife R, Wu SC, Pledger G, and the Topiramate YP Study Group. A double-blind, randomized trial of topiramate as adjunctive therapy for partial-onset seizures in children. *Neurology* 1999; 52:1338-44.
- Ferrari A, Tiraferi I, Neri L, Sternieri E. Clinical pharmacology of topiramate in migraine prevention. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011; 7: 1169-81.
- Freilinger T, Anttila V, De VB, 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, Lehtimaki T, Vila-Pueyo M, Gobel H, Wichmann E, Sintas C, Uitterlinden AG, Hofman A, Rivadeneira F, Heinze A, Tronvik E, Van Duijn CM, Kaprio J. et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet.* 2012;15:777–782. doi: 10.1038/ng.2307.
- Freitag FG. Importance of botulinum toxin for prevention of migraine. *Xpert Rev Neurother* 2010; 10:339-40.
- Geppetti P, De Cesaris F, Nicoletti P, Benemi S. Chronic headaches and medication overuse. *Intern Emerg Med* 2010; 5: S7-11.
- Headache Classification Committee. New appendix criteria open for a broader concept of chronic migraine. *Cephalalgia* 2006;26: 742-6.
- Headache Classification Subcommittee of the international Headache Society. The international Classification of Headache Disorders. 2nd edition. *Cephalalgia* 2004; 24: 24-37
- Johnson MP, Fernandez F, Colson NJ, Griffiths LR. A pharmacogenomic evaluation of migraine therapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2007; 8(12): 1821-35.
- Lainez-Andrés JM. Onabotulinumtoxin A en el tratamiento de la migraña crónica. *Rev Neurol* 2012; 54 (supl 2): S39-S50.
- Ligthart L, De VB, 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, Breteler M, Ferrari MD, Launer LJ, Van Duijn CM, van den Maagdenberg AM, Boomsma DI. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Eur J Hum Genet.* 2011;15:901–907. doi: 10.1038/ejhg.2011.48.
- Lipton RB, Silberstein S, Dodick D et al. Topiramate intervention to prevent transformation of episodic migraine: The topiramate INTREPID study. *Cephalalgia* 2011; 31: 18-30.
- Meisler MH, Kearney JA (2005). Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest* 115: 2010-2017.
- Moseley AE, Lieske SP, Wetzel RK et al. (2003). The Na,K-ATPase alpha 2 isoform is expressed in neurons and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice. *J Biol Chem* 278: 5317-5324.
- Marmura MJ, Silberstein SD. Current understanding and treatment of headache disorders: five new things. *Neurology* 2011; 76 (Suppl 2): S31-6.

- Mathew NT, Jaffri SF. A double-blind comparison of onabotulinumtoxinA (Botox) and topiramate (Topamax) for the prophylactic treatment of chronic migraine: a pilot study. *Headache* 2009; 49: 1466-78.
- Mathew NT. Pathophysiology of chronic migraine and mode of action of preventive medications. *Headache* 2011; 51(Suppl. 22):84-92.
- McLean MJ, Bukhari AA, Wamil AW. Effects of topiramate on sodium-dependent potential firing by mouse spinal cord neurons in cell culture. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl 1): S21-4.
- Naumann M, So Y, Argoff CE, Childers MK, Dykstra DD, Gronseth GS, et al; Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Assessment: botulinum neurotoxin in the treatment of autonomic disorders and pain (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2008; 70: 1707-14
- Nieto-Barrera M. Characteristics and Indications of Topiramate. *Rev Neurol* 2002; 35 (Supl 1): S88-95.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN et al. (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* 87: 543-552.
- Pascual J. Migraña crónica: tratamiento. *Rev Neurol* 2012; 54(Suppl 2): S31-S38
- Pascual J, Sánchez del Río M, Mateos CV, Láinez JM, Hernández-Gallego J, Leira R, et al. Topiramate for patients with refractory migraine: an observational, multicenter study in Spain. *Neurología* 2004; 18: 364-7.
- Sachdeo RC, Glauser TA, Ritter F, Reife R, Lim P, Pledger G and the topiramate YL Study Group. A double-blind, randomized trial of topiramate in Lennox-Gastaut syndrome. *Neurology* 1999; 52: 1882-7.
- Sarchielli P, Granello F, Prudenzano MP, et al. Italian guidelines for primary headaches: 2012 revised version. *J Headache Pain* 2012; 13: S31-70.
- Shank RP, Gardocki JFC, Streeter AJ, Maryanoff BE. An overview of the preclinical aspects of Topiramate: Pharmacology, pharmacokinetics and mechanism of action. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl 1): S3-9.
- Silberstein SD, Lipton RB, Dodick DW, Freitag FG, Ramadan N, Mathew N, et al. Efficacy and safety of topiramate for the treatment of chronic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Headache* 2007; 47: 170-80.
- Silberstein S, Mathew N, Saper J, Jenkins S; for the Botox Migraine Clinical Research Group. Botulinum toxin type A as a migraine preventive treatment. *Headache* 2000; 40: 445-50.
- Skaradski S, Withe HS. Topiramate blocks kainate-evoked cobalt influx into cultured neurons. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl 1): S45-7.
- 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.
- Troost BT. Botulinum toxin type A (Botox) in the treatment of migraine and other headaches. *CExpert Rev Neurother* 2004; 4: 27-31.
- V.D Maagdenberg AM, Terwindt GM. Genetics of headaches. *Handb Clin Neurol*. 2010; 97:85-97.
- Visens L S. Actualización en la prevención y tratamiento de la migraña, *Medicina (Buenos Aires)* 2014; 74: 147-157.
- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLD) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380: 2163-2196.
- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolff HH. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increase seizure threshold. *Epilepsy Res* 1997; 27: 167-79.
- Zhang X, Velumian AA, Jones OT, Carlen PL. Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl 1): S52-60.