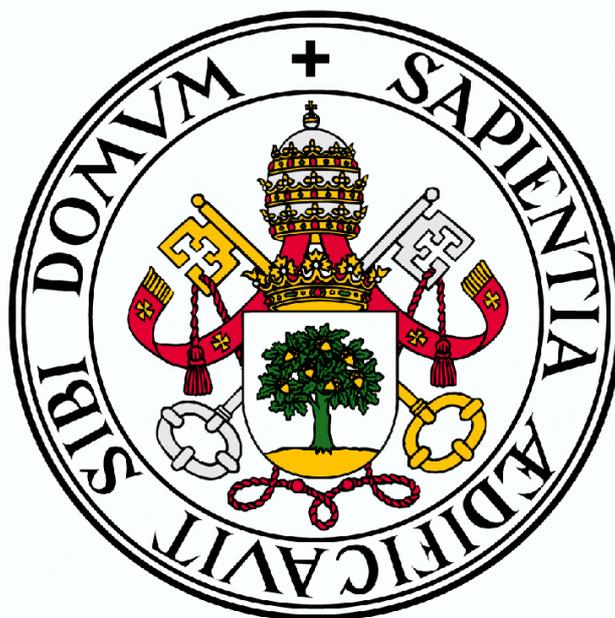


Junio 2016

TRABAJO FIN DE GRADO MEDICINA

PATRONES DE EXPRESIÓN GENÓMICA EN PACIENTES
CON MIGRAÑA EPISÓDICA Y MIGRAÑA CRÓNICA:
ESTUDIO PILOTO MEDIANTE ANÁLISIS DE ARN CON
PCR DIGITAL



Autor: *Pablo Rodríguez González*

Tutores: - *Angel L Guerrero, Profesor Asociado UVA, Servicio de Neurología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid*

- *Jesús. F Bermejo-Martín, Grupo de Infección e Inmunidad, IECSCYL-SACYL, HCUV*

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	2
<u>INTRODUCCIÓN</u>	
- MIGRAÑA Y MIGRAÑA CRÓNICA.....	3
- FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA.....	6
- GENÉTICA MOLECULAR DE LA MIGRAÑA.....	9
<u>HIPÓTESIS</u>	16
<u>OBJETIVOS</u>	16
<u>METODOLOGÍA DEL PROYECTO</u>	17
<u>RESULTADOS</u>	18
<u>DISCUSIÓN</u>	24
<u>CONCLUSIONES</u>	25
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	26

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La migraña es una enfermedad de origen multifactorial e importante carga genética. En los últimos años se han identificado algunos genes que podrían estar implicados en la aparición, la severidad o la respuesta al tratamiento de la migraña y que codifican moléculas que intervienen en su fisiopatogenia. También se han estudiado los genes relacionados con la rara y monogénica Migraña Hemipléjica Familiar (MHF) buscando su posible intervención en la Migraña sin aura. Nuestro objetivo es buscar patrones de expresión génica en pacientes migrañosos utilizando la tecnología de la PCR digital

MÉTODOS. Seleccionamos pacientes con migraña atendidos en una Unidad de Cefaleas de un hospital terciario. Los diagnósticos de Migraña Episódica (ME) y Migraña Crónica (MC) se realizan de acuerdo con los criterios de la III Edición de la Clasificación Internacional de Cefaleas (CIC-3). Utilizamos la última tecnología en análisis por PCR, la PCR digital, que nos permite obtener un valor cuantitativo de las muestras y con una mayor reproductibilidad. En una primera fase de nuestro proyecto de investigación nos centramos en 5 genes con expresión conocida en el leucocito de sangre periférica (MTDH, SLC6A4, ACE, NOTCH3, TGFBR2). Utilizamos como gen de referencia el GAPDH.

RESULTADOS. Analizamos las muestras de 20 pacientes, 11 con MC y 9 con ME. Encontramos expresión en pacientes migrañosos en los genes TGFBR2 y MTDH. Observamos que para el gen de la metadherina (MTDH), la mediana del número de copias MTDH/GAPDH expresadas es mayor en los migrañosos episódicos que en los crónicos. Por encima del valor $p=0,077$ de copias MTDH/GAPDH expresadas por el linfocito en sangre periférica la probabilidad de un migrañoso a sufrir una migraña episódica es 8,2 veces mayor que la de sufrir una migraña crónica.

CONCLUSIÓN. Si bien la serie actual es reducida y estos resultados han de considerarse preliminares, existen genes implicados en la migraña cuya expresión en sangre periférica es detectable en pacientes migrañosos. El gen de la Metadherina podría expresarse de forma diferente en pacientes con ME y MC.

INTRODUCCIÓN

- MIGRAÑA Y MIGRAÑA CRÓNICA

La migraña es una cefalea primaria frecuente e incapacitante. De acuerdo con el estudio *Global Burden of Disease Survey 2010*, es el tercer trastorno más prevalente y la séptima causa de años vividos con discapacidad en todo en el mundo.

La migraña constituye una de las enfermedades médicas más frecuentes y una de las primeras causas de derivación a asistencia neurológica ambulatoria. Según criterios de la *International Headache Society (IHS)* la prevalencia es del 9% para la migraña sin aura y 6% para la forma con aura, y por sexos las cifras son del 8% para los varones y 25% para las mujeres.

En cuanto a la incidencia, Stewar y cols (1) estiman que la migraña con aura en el varón alcanza su pico alrededor de los 5 años de edad, con una cifra de 6,6/1000 personas al año; para la migraña sin aura sería de 10/1000 personas al año y lo haría entre los 10 y 11 años. En el caso de la mujer la MA alcanzaría su pico entre los 12-13 años y con una cifra de 14,1/1000 personas al año y la MO entre los 14-17 años con unas tasas de 18,9/1000 al año. Esto hace que hasta la pubertad las cifras de prevalencia sean mayores en niños que en niñas; a partir de entonces la prevalencia es considerablemente superior en las mujeres, alcanzando su máximo entre los 40 y 45 años.

En la tabla 1. Figuran los criterios diagnósticos de la migraña, revisados en la III Edición de la clasificación de cefaleas (2).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la migraña

- | |
|--|
| <p>A. Al menos 5 crisis que cumplen los criterios B-D</p> <p>B. Episodios de cefalea de entre 4 y 72 horas de duración
(no tratados o tratados sin éxito)</p> <p>C. La cefalea presenta al menos 2 de las siguientes características:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Localización unilateral2. Carácter pulsátil3. Dolor de intensidad moderada o severa4. Condiciona el abandono de la actividad física habitual <p>D. Al menos 1 de los siguientes durante la cefalea:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Náuseas y/o vómitos2. Fotofobia y fonofobia <p>E. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la ICHD-III.</p> |
|--|

Alrededor del 15-30% de los pacientes presentan sintomatología neurológica focal transitoria inmediatamente antes del dolor o coincidiendo con su aparición, que es lo que se conoce como aura migrañosa. Los síntomas más característicos son los visuales que, si bien pueden ser muy diversos, suelen consistir en escotomas con componente irritativo. En otras ocasiones, el aura provoca alteración en la sensibilidad y hormigueo que afecta a la mitad de la lengua y se extiende progresivamente al labio, la mejilla, el miembro superior y la mano del mismo lado. Con menos frecuencia pueden producirse déficit motores o en el lenguaje. Todos los síntomas producidos por el aura migrañosa son reversibles y desaparecen en menos de una hora.

La Migraña Crónica (MC) es el frecuente resultado de la evolución de una Migraña Episódica (ME), de forma que el paciente presenta cefalea al menos la mitad de los días, siendo entre ellos la mitad un dolor de características típicamente migrañosas

En la tabla 2 figuran los criterios diagnósticos de la migraña crónica (2).

Tabla 2. Criterios diagnósticos de migraña crónica

A. Cefalea (tipo tensión o migraña), ≥ 15 días al mes durante al menos 3 meses
B. Al menos 5 crisis que cumplen con los criterios para migraña sin aura
C. Durante ≥ 8 días al mes y al menos 3 meses, la cefalea ha cumplido los siguientes criterios C1 o C2 (dolor y síntomas asociados de migraña sin aura): C1. Al menos 2 de los siguientes: a) Localización unilateral b) Calidad pulsátil c) Intensidad moderada o grave d) El dolor se agrava con la actividad física rutinaria o condiciona evitarla (p.ej., caminar o subir escaleras) junto con al menos 1 de los siguientes: - Náuseas o vómitos - Fotofobia y fonofobia C2. Alivio de la cefalea con triptanes o ergóticos antes del esperado desarrollo de los criterios C1
D. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la ICHD-III.

Se estima que un 2,4% de los adultos sufren de migraña crónica. Es importante destacar que la prevalencia de la migraña crónica es entre 2,5 y 6,5 veces mayor en mujeres (1,7%- 4,0%) que en hombres (0,6%-0,7%).

Uno de los factores que con mayor frecuencia contribuye a la cronificación de la migraña es el uso excesivo de medicación sintomática. Estudios previos sugieren que esto ocurre más rápidamente con el uso excesivo de triptanes o ergotamínicos que con analgésicos o anti-inflamatorios.

Aparte del uso excesivo de medicación, se han descrito multitud de factores favorecedores de la cronificación de la migraña. Los principales figuran en la Tabla 3.

Tabla 3. Factores de riesgo para desarrollar migraña crónica	
No modificables	Edad avanzada Género femenino Etnia caucásica Estatus socioeconómico bajo Nivel educativo bajo
Modificables	Ansiedad, depresión, estrés, eventos vitales estresantes Trastorno del ritmo del sueño, síndrome de apnea del sueño Abuso de medicación, de cafeína Obesidad Elevada frecuencia de crisis
Putativos	Factores proinflamatorios y protromboticos

- FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA

Si bien no conocemos todavía la causa para la mayoría de los ataques de migraña, sí que se ha clarificado en gran medida la fisiopatología íntima de los mismos.

Cuando se inicia un ataque de migraña con aura, inicialmente se registra una hiperemia de una duración aproximada de 3 minutos, seguida de una hipoperfusión cortical occipital, consistente en una disminución del 20-30% del flujo sanguíneo cerebral regional que se mantiene sobre unas dos horas, con supresión de la actividad visual (los escotomas son el síntoma más típico del aura) y propagación de esta disminución del flujo a una velocidad aproximada de unos 3 mm por minuto hasta que se detiene al alcanzar el surco parieto-occipital. A la media hora del inicio, esta onda de hipoperfusión que avanza a unos 2-3 mm por minuto, alcanza la corteza sensitivo-motora, recorriendo los surcos corticales y persistiendo por un espacio de 4 a 6 horas hasta que alcanza el lóbulo frontal. El fenómeno consistiría en una depresión cortical propagada en relación con una despolarización gradual neuroglial liberadora de potasio, precedida de una onda de actividad metabólica incrementada (se multiplica la concentración extracelular de potasio, y aumenta el calcio, el cloro y el sodio intracelular) que podría desencadenarse por estímulos experimentales. Trabajos posteriores (3) manejando el flujo sanguíneo cerebral regional demuestran que se puede producir una disminución del mismo en humanos como consecuencia

de una depresión propagada, ya que la velocidad de propagación es aproximadamente la misma. Esta teoría neurogénica sólo puede explicar la existencia de una migraña con aura, ya que en la migraña sin aura no se han demostrado alteraciones del flujo sanguíneo cerebral regional. Es decir, primero se produce una activación neuronal y después una dilatación vascular secundaria con un incremento del flujo sanguíneo, seguida de una onda de depresión de la actividad neuronal y en consecuencia una oligohemia que no llega a producir una isquemia. Las primeras áreas activadas en el aura son las primeras en recuperarse. Se sabe que el glutamato y el aspartato son capaces de inducir esta depresión propagada, mientras que los antagonistas competitivos y no competitivos de los receptores NMDA pueden bloquear este fenómeno.

La siguiente cuestión en el inicio del aura migrañosa estaría relacionada con la investigación de todos aquellos factores que fueran capaces de desencadenarla. Actualmente se encuentran todavía en fase experimental las siguientes teorías:

1. La presencia de niveles bajos de magnesio. Esta teoría se basa en la demostración, en personas afectas de migraña, de niveles bajos de magnesio en suero, LCR, células sanguíneas y saliva. La tasa baja de magnesio puede producir una inadecuada apertura de los canales del calcio, facilitando la liberación de aminoácidos excitadores mediante el aumento del calcio intracelular.(4). Los bajos niveles de magnesio también han sido relacionados con la vasoconstricción, el aumento de la serotonina y el aumento de la agregación plaquetaria.

2. Importancia del óxido nítrico.La cefalea migrañosa puede ser abortada o prevenida bien mediante los agentes que disminuyen la liberación de óxido nítrico, como los triptanes, la metisergida o la ciproheptadina, o bien reduciendo la actividad que tiene la sintetasa del óxido nítrico, que la realizan aquellas sustancias que bloquean los canales del calcio. Se ha demostrado que un inhibidor inespecífico de la sintetasa del óxido nítrico, el clorhidrato de l-metil-arginina, es muy eficaz en el tratamiento de los episodios de migraña severos. En algunas familias con mutaciones cromosómicas que codifican regiones de los canales del calcio sensibles al voltaje, se ha podido observar que sus accesos migrañosos dolorosos responden a los agentes bloqueantes inespecíficos de los

canales del calcio administrados de forma profiláctica, pues los antagonistas de los canales del calcio reducen la síntesis de óxido nítrico (5). Está claro que, cuando existe una alteración genética de los canales del calcio, se incrementa la síntesis de óxido nítrico, y se induce la hiperexcitabilidad cortical y el aura. Se eleva el potasio extracelular al desestabilizarse las membranas neurogliales, con lo que se inicia la depresión cortical propagada. (6)

Finalmente el dolor en la migraña es autolimitado en su duración y con una evolución remitente recurrente. Es posible que en la secuencia de las alteraciones anatomofisiológicas se sigan unas determinadas directrices (7): En primer lugar, y activado por el óxido nítrico, se produciría una activación del rafe dorsal del tronco cerebral o del núcleo caudal del trigémino. Posteriormente se produce una vasodilatación meníngea, como consecuencia de una estimulación del sistema trigémino-vascular, que por un lado produce una activación de las terminales nerviosas sensoriales trigeminales que van a transmitir los impulsos nociceptivos al núcleo caudal del tronco cerebral

Tras la activación de estas terminales, se produce la liberación de algunos neuropéptidos vasoactivos, como la sustancia P, que se encuentra relacionada con el gen de la calcitonina, mediante un reflejo axo-axonal. Estas sustancias liberadas pueden dar lugar a la denominada inflamación neurógena, induciendo la vasodilatación y posterior extravasación de proteínas plasmáticas. En este momento, el paciente aprecia el típico dolor pulsátil, independientemente del estado del flujo hemisférico. Las fibras del trigémino activadas de forma patológica transmiten la información nociceptiva a través del núcleo caudado hacia los núcleos superiores, provocando por un lado el proceso inflamatorio de los vasos sanguíneos extracerebrales, mediante la percepción consciente del dolor y, por otro, el desencadenamiento del resto de la sintomatología migrañosa, mediante la activación del centro del vómito y otros centros vegetativos (8).

Casi todo el proceso se encuentra modulado por receptores serotoninérgicos de varios tipos (cuya interacción dinámica aún no se conoce del todo), tales como los receptores vasoconstrictores situados en el músculo liso de los vasos meníngeos, los receptores vasodilatadores localizados en el endotelio de los vasos meníngeos y los receptores inhibidores trigeminales 5-HT_{1D} que normalizan el calibre vascular inhibiendo la actividad trigeminal. Como

epifenómeno se produce una activación plaquetaria que es la que va a justificar los cambios en los niveles de serotonina plaquetaria que se han descrito, y la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC), que parece ser un marcador de la activación trigeminal, y por tanto un marcador de la migraña.

- GENÉTICA MOLECULAR DE LA MIGRAÑA

Desde hace largo tiempo se conoce que la migraña es una cefalea primaria que a menudo se repite en varios miembros de una misma familia. Para afirmar que la migraña se hereda disponemos del riesgo de recurrencia en familias (riesgo familiar/riesgo en la población general), que es elevado (alrededor del 50%). Respecto a las diferentes formas de migraña, se sugiere que tienen una heredabilidad diferente. Así, en términos de riesgo relativo, los familiares de primer grado de pacientes con Migraña sin aura tienen 1,9 veces el riesgo de padecer migraña sin aura y 1,4 veces de padecer migraña con aura, mientras que familiares de primer grado de pacientes Migraña con aura tienen hasta 4 veces el riesgo de padecer migraña con aura pero ningún riesgo aumentado para sufrir migraña (9). Sin embargo, para determinar la heredabilidad de la migraña el análisis de la concordancia en gemelos ha sido la herramienta más fiable. Este método compara el grado de concordancia observada en gemelos monozigotos (comparten el mismo ambiente y tienen la misma carga genética) y dizigotos (en el mismo ambiente comparten la mitad del genoma). El estudio más reciente y amplio llevado a cabo por el grupo danés incluyó 1013 gemelos monozigotos y 1667 pares de gemelos dizigotos (10). La razón de concordancia por pares fue significativamente más alta entre los gemelos monozigotos que entre los dizigotos para la migraña sin aura (MO) (28 vs. 12 por ciento) y para la migraña con aura (MA) (34 vs. 12 por ciento). La carga hereditaria o 'heredabilidad' se ha estimado de este modo en un 40-60 por ciento, y es mayor para la MCA. Una vez establecido el carácter genético de la migraña, ¿cómo se hereda? El modo de transmisión de la migraña no se ajusta a ningún modo de herencia mendeliana. Los estudios segregacionales

demuestran que los subtipos de migraña MA y MO tienen una herencia multifactorial no mendeliana y que existe una fuerte influencia medioambiental.

Siendo posible desencadenar en cualquier persona los acontecimientos relacionados con la migraña, se ha podido demostrar que existe una susceptibilidad genética hereditaria, que como resultado final común muestra un bajo umbral excitatorio para que las neuronas puedan ser activadas. Para explicar la enorme variedad semiológica en los diversos cuadros clínicos en la migraña, con la presencia o ausencia de aura y diversos factores desencadenantes, es necesario recurrir a la necesidad de una herencia compleja poligénica con una penetrancia variable. Diversos factores ambientales y genéticos están involucrados en el aumento del riesgo a padecer la enfermedad. La identificación de los genes se torna difícil debido a la alta prevalencia y la alta heterogeneidad genética y fenotípica.

Para hallar las posibles contribuciones genéticas a la enfermedad, se han enfocado muchos estudios en torno a una forma rara y monogénica que también manifiesta los síntomas migrañosos: la **Migraña Hemipléjica Familiar (MHF)**. En contraste con las formas comunes de la migraña, mucho más complejas, esta forma rara de migraña con aura motora es un ejemplo de subtipo monogénico que podría considerarse un modelo para las formas comunes de la enfermedad porque, a excepción de la hemiparesia que presentan los enfermos, el patrón de la cefalea es la misma.

Tres genes han sido identificados en las múltiples familias con esta enfermedad:

- **Gen CACNA1A (Km 19p13)** responsable de la subunidad $\alpha 1$ de canales de calcio en las neuronas. Hay 21 tipos de mutaciones diferentes, todas ellas missense. El 50-75% de las familias con MHF tienen una mutación en este gen. Encontramos también mutaciones en este gen en enfermedades como la Ataxia episódica tipo 2 (EA-2) y la ataxia espinocerebelosa (SCA-6).
- **Gen ATP1A2 (km 1q23)**, que codifica la subunidad $\alpha 2$ de canales de sodio-potasio en neuronas. Hay 30 tipos de mutaciones, se han observado en migraña

común, hemiplejía alternante, migraña de tipo basilar y las convulsiones infantiles benignas. En los estudios se constata que con el gen mutado los canales de Na⁺ y K⁺ son insensibles a la inactivación por empleo de ouabaína: hay una disminución de la función de la bomba Na⁺/K⁺, disminuyendo de esta forma el consumo de K⁺ y de glutamato en las células gliales. (11).

- **Gen SCN1A (km 2q24)**, que codifica la subunidad $\alpha 1$ de canales de sodio. 100 tipos de mutaciones, relacionado con la epilepsia generalizada febril y las mioclonías severas infantiles. Se observa que el tiempo de recuperación de la inactivación del canal seguido de despolarización es más rápido. Esta hiperexcitabilidad del canal, sin embargo, es más acusada para las mutaciones que también dan lugar a la epilepsia en comparación con aquellas que sólo dan lugar a la migraña. Estos resultados refuerzan las extraordinarias similitudes que existen entre la migraña y la epilepsia desde el punto de vista de la biología molecular. Los datos del trabajo de Martin Dichghans (12) sugieren que la diferencia entre la migraña y la epilepsia reside en el grado de hiperexcitabilidad capaz de condicionar la mutación. Ello explica bien, por ejemplo, la eficacia de los fármacos antiepilépticos en la migraña a dosis más bajas que las utilizadas en la epilepsia.

Sin embargo hay familias con MHF sin ninguna de estas 3 mutaciones, por lo que hay más genes involucrados en esta enfermedad por encontrar. Recientes estudios descubrieron un ligamiento al cromosoma 14q32 en una familia española (Cuenca, León et al 2005)

El mecanismo patogénico de la MHF sería por tanto el siguiente: en resultado de la mutación del gen CACNA1A, aumenta la probabilidad de apertura de canales de Ca²⁺ (se abren con voltajes más negativos) y a esto le sigue un aumento de la liberación de glutamato. A continuación, debido a la mutación del gen ATP1A2 el glutamato permanece más tiempo en las hendiduras sinápticas, así como el K⁺. En consecuencia las neuronas se despolarizan más fácilmente produciendo la depresión cortical, que podrá propagarse rápidamente vista la mutación causal del último gen conocido SCN1A, y generando así el aura migrañosa.

Se han realizado multitud de estudios entorno al primer gen de la MHF para tratar de ver si las variantes alélicas de este gen intervienen en la migraña no hemipléjica. Todavía no se sabe con certeza, pero en los estudios de ligamiento realizados en familias con MA y MO se ha observado un exceso de alelos de la región 19p13 compartidos en las familias con migraña clásica, lo que sugiere cierta participación etiológica del gen CACNA1A o de la región que lo contiene, pero no se han identificado las mutaciones responsables. La demostración de que los migrañosos con aura no hemipléjica sufren una sutil disimetría cerebelosa entre las crisis de migraña, la similitud clínica como canalopatías de la MO y de la MA, eran motivos suficientes para investigar el gen CACNA1A en las variantes de migraña no hemipléjica. Mientras que algunos pedigrís muestran ligamiento a marcadores de CACNA1A, otros pedigrís, aún cuando muestran ligamiento a los marcadores de la región 19p13, éste parece ser distinto del locus MHF1; es decir, que si bien el gen CACNA1A puede ser el responsable de la MCA en algunas familias, no se descarta que otros genes adyacentes (teloméricos) lo sean en otras.

Los estudios del ligamiento genético ayudan a identificar los genes candidatos posicionales –genes identificados por su posición relativa a los marcadores genéticos utilizados, en oposición a los genes funcionales que se originan de las observaciones de las vías bioquímicas que subyacen en la enfermedad-. La implicación de tales genes funcionales puede evaluarse mediante el análisis de su actividad, pero también vía ligamiento genético si esos genes se muestran polimórficos en la población general. Desafortunadamente, los resultados se han mostrado poco consistentes (no se han detectado todavía mutaciones causales ni polimorfismos) y sólo unos pocos se han podido replicar en estudios independientes. Los resultados más replicables se han obtenido al estudiar la Migraña Hemipléjica Familiar, encontrándose los loci implicados descritos en los párrafos anteriores. Se piensa que esta circunstancia pueda estar en relación con la heterogeneidad del locus, una baja penetrancia, o la expresión con fenotipos diferentes de un mismo genotipo, entre otros (13).

En los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) tampoco, hasta hoy, se han obtenido resultados claros. Sólo algunos datos han sido reproducidos y, en todo caso, las asociaciones descritas sólo suponen un

pequeño aumento del riesgo de migraña. Los primeros esfuerzos de identificación de los genes de migraña se han dirigido hacia los genes que codifican las moléculas implicadas en la fisiopatología de la migraña como los receptores de serotonina, los canales iónicos y las citocinas, identificando variantes alélicas con mayor o menor repercusión funcional. A falta de resultados positivos con estos loci, los investigadores han desarrollado técnicas de rastreo genético que comprenden todo el genoma, mediante el empleo de aproximadamente 300 marcadores que se distancian en el genoma unos de otros unos 5-10 cM. Una vez localizados los puntos “calientes”, se procede a identificar los genes próximos (candidatos posicionales) y al análisis mutacional de aquellos que posiblemente participan en los mecanismos de la migraña, cuando éstos son conocidos, o a la identificación de los mismos si no lo son.

Destacarían por tanto los siguientes genes, que serán centro de nuestro estudio, pues codifican diferentes sustancias implicadas en la fisiopatología de la migraña:

- Genes implicados en el glutamato:

✓ **Gen MTDH: Metadherin**

Un estudio asoció un polimorfismo de nucleótido único (SNP), el rs1835740, con la migraña (14). El rs1835740 está localizado en el cromosoma 18q22, entre dos genes que influyen en la homeostasis del glutamato: PGCP (glutamato carboxipeptidasa plasma), responsable de la hidrólisis de péptidos circulantes, y MTDH (metaderina), que regula un gen que codifica para un transportador principal de glutamato en el cerebro.

✓ **Gen EAAT2: Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter) member 2**

Los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT2), hallados mediante inmunohistoquímica en los ganglios trigeminales (15) juegan un papel en la regulación de los niveles de glutamato en el SNC: así lo demostraban estudios en los que se emplea cloruro potásico para evocar la liberación de glutamato por las células de la glia en ratones tratados con un inhibidor del EAAT1/2 EAAT2

(TFB-TBOA) o en ratones control, observándose una reducción significativa de la concentración de glutamato en el primer grupo. (16). En efecto, EAAT2 lleva el glutamato dentro de los astrocitos para una conversión a glutamina, que luego es liberada y reciclada por las neuronas para regenerar el glutamato. Localizado en el cromosoma 11q13-13, algunos polimorfismos podrían afectar la regulación de este neurotransmisor y crear diferencias transcripcionales. Sin embargo, ningún estudio ha hallado una asociación entre los polimorfismos y la migraña.

✓ **Gen GRIK3: Glutamate receptor ionotropic kainite 3**

Codifica para un subtipo de receptor de kainato que pertenece a la familia de canales iónicos activados por ligandos. Estudios demuestran que aquí es donde actúa el topiramato(17), antagonizando la capacidad del kainato para activar el receptor del glutamato e inhibiendo así la transmisión excitatoria en el complejo trigeminocervical y en el núcleo ventroposteromedial del tálamo.

- Genes implicados en la dopamina y serotonina

Es evidente el papel que tienen estos 2 neurotransmisores en la enfermedad, sin embargo no se han hallado estudios que hayan concluido una asociación entre los polimorfismos escogidos y una predisposición a la migraña.

✓ **Gen DRD2: Dopamine receptor D2**

No se encontró una asociación para la susceptibilidad, pero un reciente estudio halló un efecto protector de la variante polimórfica DRD2 rs6275 frente a la enfermedad (18)

✓ **Gen SLC6A4: Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonine) member 4**

La serotonina parece jugar un papel fundamental en la migraña. Siguiendo la liberación axonal del neurotransmisor, la acción de la serotonina es rápidamente finalizada por la recaptación sináptica gracias a su transportador SLC6A4 (predominantemente expresado en el SNC). Un polimorfismo en el intrón 2 de este gen ha sido descrito (19), consistiendo en un número variable de repeticiones en tándem (STin2 VNTR). Este polimorfismo comprende 2 alelos mayoritarios: STin2.10 y STin2.12 (10 o 12 repeticiones). Se han encontrado resultados replicables de que los alelos no STin2.12 tienen un efecto protector

sobre la migraña en comparación con los alelos STin2.12 y los genotipos 10/12 o 10/10, al menos entre la población europea (20)

- Genes vasculares

Siguiendo la teoría vascular de la migraña, varios grupos de investigación analizaron genes de diferentes factores vasculares implicados en el endotelio como por ejemplo el **gen de la enzima convertora de la angiotensina I (ACE 1)** y la **óxido nítrico sintasa (NOS 2)** entre otros.

Otro gen de origen vascular estudiado en la migraña es el **NOTCH3**, que codifica un receptor transmembrana de la pared arterial debido a que mutaciones en este gen causen el CADASIL, una arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía, que incluye entre sus síntomas episodios de MA. Es oportuno recordar que el gen NOTCH3 está situado centroméricamente a CACNA1A.

- Genes hormonales

Englobamos aquí genes relacionados con el metabolismo del estrógeno y **progesterona**

- Genes implicados en GABA: GABRQ y GABRA3

En el estudio de receptores de GABA en pacientes migrañosos (21) se indentificó una infraexpresión de la subunidad alfa 3 del receptor de **GABA A (GABRA3)** y del receptor GABA B tipo 2 (GABBR2) en los sujetos migrañosos frente a los controles.

- Genes implicados en factores inflamatorios:

✓ **IL1alfa**

✓ **TGFBR2 (transforming growth factor beta receptor II)**

El locus 3p24 que contenía el polimorfismo SNP rs7640543 mostró una importante replicación y alta significancia en un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) de 2326 pacientes alemanes y holandeses con clínica y 4580

controles (22). Rs7640543 está ubicado en el gen *TGFBR2* (transforming growth factor beta receptor 2), que codifica una serina-treonina kinasa implicada en la regulación de la proliferación celular así como en la producción de matriz extracelular. La mutación missense p.Arg460His no sólo aumenta el riesgo de disección aórtica, síndrome de Marfan o síndrome de Rendu-Osler-Weber, sino también el de migraña en 11 de 14 portadores de esta mutación(23). Esto encajaría con el hecho de que los migrañosos tengan incrementado el riesgo de sufrir una disección aórtica.

HIPÓTESIS

Planteamos 2 hipótesis de partida:

- 1) La cuantificación en sangre periférica de ARN de genes implicados en la fisiopatología de la migraña gracias a la tecnología de la PCR digital nos podría permitir identificar patrones de expresión génica propios de migraña episódica y migraña crónica.
- 2) El patrón de expresión génica observado en la migraña crónica podría cambiar en el momento de su paso a migraña episódica mediante el tratamiento médico estándar.

OBJETIVOS:

- Establecer la expresión linfocitaria de genes relacionados con la fisiopatología de la migraña mediante la PCR digital
- Cuantificar en aquellos genes que se expresan en linfocitos en sangre periférica su presencia en pacientes con migraña episódica y migraña crónica así como una posible diferencia entre ambas poblaciones

METODOLOGÍA DEL PROYECTO:

Se seleccionan pacientes diagnosticados de Migraña episódica y Migraña crónica de acuerdo con la CIC-3, atendidos en la Unidad de Cefaleas del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

En ellos se registrarán variables demográficas y clínicas, incluyendo el número de días al mes de cefalea y cefalea migrañosa

Se realiza en todos ellos una extracción de una muestra de sangre periférica venosa en el miembro superior. Ésta se procesó para determinar la expresión génica de los biomarcadores seleccionados.

Para ello se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es una técnica de biología molecular que permite la amplificación de material genético, es decir, obtener un gran número de copias del ADN, ARN o una proteína en estudio a partir de una muestra pequeña inicial. Consiste en una repetición de 30-35 veces de un ciclo de reacciones realizadas en un termociclador con las que se multiplica de forma exponencial el material genético molde.

Con el fin de obtener una mayor amplificación y reproductibilidad en nuestro estudio, que vistos los estudios es el mayor problema a día de hoy, se empleó concretamente **la PCR digital**, (ver Fig.1) tercera generación de la tecnología de PCR, que proporciona una cuantificación absoluta de las moléculas de ácidos nucleicos. Esta técnica ofrece la capacidad de obtener un valor cuantitativo y no cualitativo, mayor sensibilidad y obtiene resultados más precisos. En esencia, funciona realizando una partición de la muestra inicial en muchos compartimentos, hasta incluso lograr que sólo se dispongan una o unas pocas moléculas de ácido nucleico en cada microcompartimento. Tras realizar el proceso de amplificación y marcaje del ácido nucleico objetivo, se obtiene un valor cuantitativo del número de reacciones que han resultados positivas, otorgando una medida directa de la cantidad de ácido nucleico inicial. A diferencia de la PCR clásica, donde se lleva a cabo una única reacción de amplificación en cada muestra, con la PCR digital se realizan numerosas reacciones, una en cada compartimento. Esto aumenta la sensibilidad de la

técnica incluso para detección de secuencias raras o poco abundantes en la muestra.

Una vez obtenidos los datos se analizaron con el fin de buscar posibles asociaciones entre los hallazgos genéticos y clínicos en las poblaciones estudiadas.

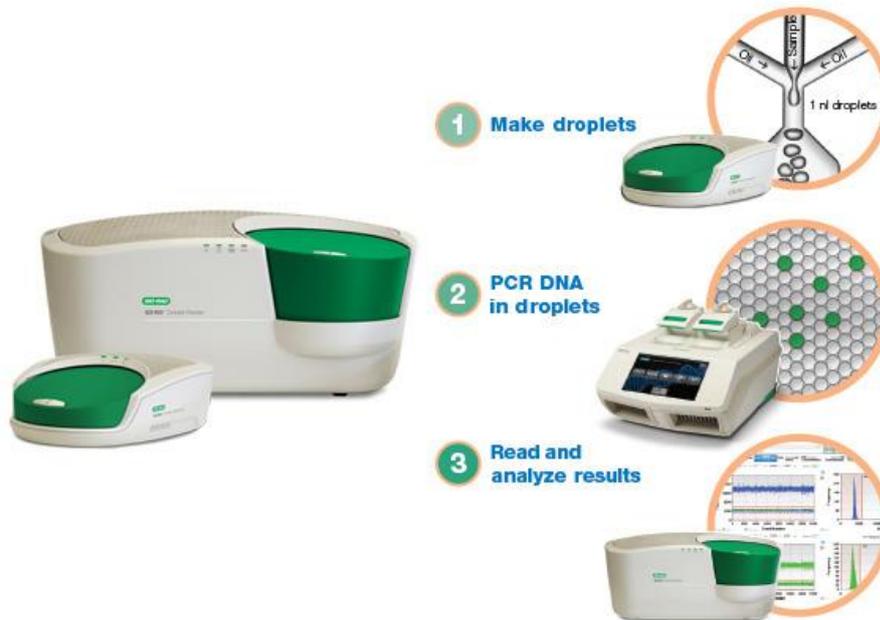


Figura 1.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 11 pacientes con migraña crónica y 9 con migraña episódica). Nos centramos en 5 genes (NOTCH3, TGFBR2, MTDH, SLC6A4, ACE), que cuantificamos de uno en uno, pero sólo encontramos resultados amplificables en 2 de ellos: TGFBR2 y MTDH.

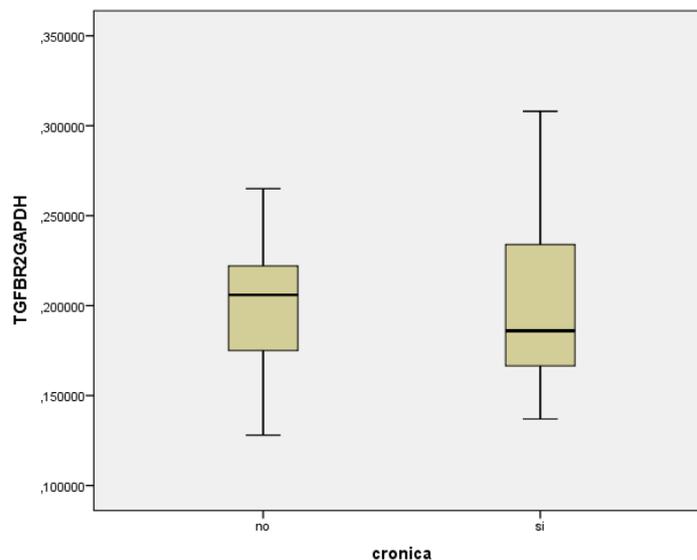
Para asegurarnos de que la cuantificación de la expresión de cada gen había sido realizada correctamente, tomamos como gen de referencia el GADPH (implicado en la glucólisis via Embden-Meyerhof, presente en todas las células). De esta forma, si en la ddPCR no se cuantificase la concentración estimada de este gen podría deberse a la mala praxis del análisis.

Medimos para cada grupo de migrañosos el coeficiente del número de copias de los genes MTDH y TGFBR2 por el de copias de GAPDH y observamos su distribución.

- GEN TGFBR2

cronica		Estadístico	Error típ.	
TGFBR2GAPDH	no	Media	,20077778	,014409466
		Intervalo de confianza para la media al 95%	,16754949	
		Límite inferior	,23400607	
		Límite superior		
		Mediana	,20600000	
		Varianza	,002	
		Desv. típ.	,043228399	
si	si	Media	,20381818	,015067013
		Intervalo de confianza para la media al 95%	,17024679	
		Límite inferior	,23738958	
		Límite superior		
		Mediana	,18600000	
		Varianza	,002	
		Desv. típ.	,049971628	

Realizamos un **diagrama de cajas** para comparar la distribución de número de copias TGFBR2/GAPDH en los 2 grupos:



Posteriormente realizamos la prueba de **U-Mann Whitney** para valorar si la diferencia entre los dos grupos es o no significativa. Elegimos esta prueba no paramétrica porque al tratarse de una muestra pequeña no vamos a poder dar por supuesto que hemos obtenido las muestras aleatorias en una distribución de normalidad o de Gauss.

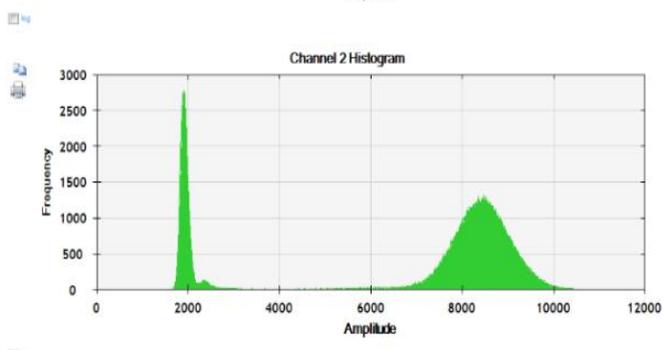
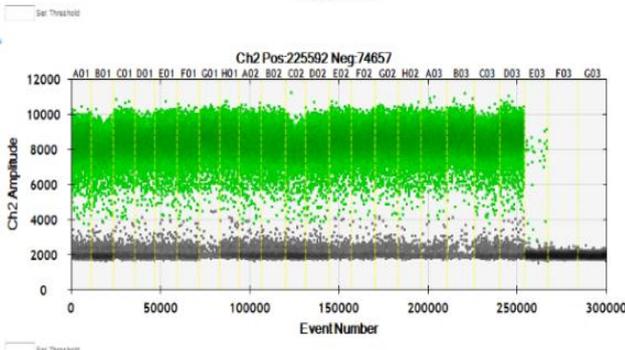
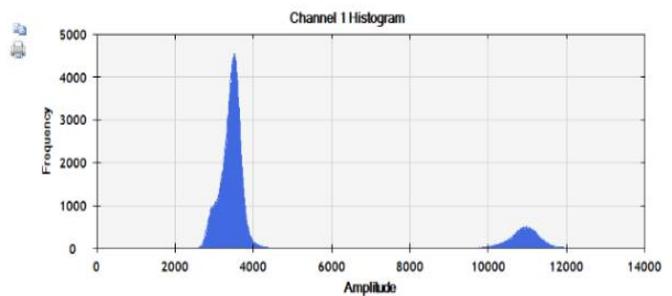
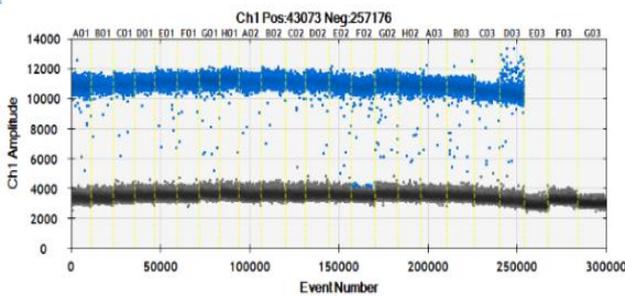
	TGFBR2GAPDH
U de Mann-Whitney	49,000
W de Wilcoxon	115,000
Z	-,038
Sig. asintót. (bilateral)	,970
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	1,000 ^b

Al ser el IC del 95% asumimos un error del 5% (nivel de significancia), que corresponde con la máxima cantidad de error que estamos dispuestos a aceptar para dar como válida la hipótesis del investigador. Observamos que el nivel de significancia (p valor) es muy superior a 0,05.

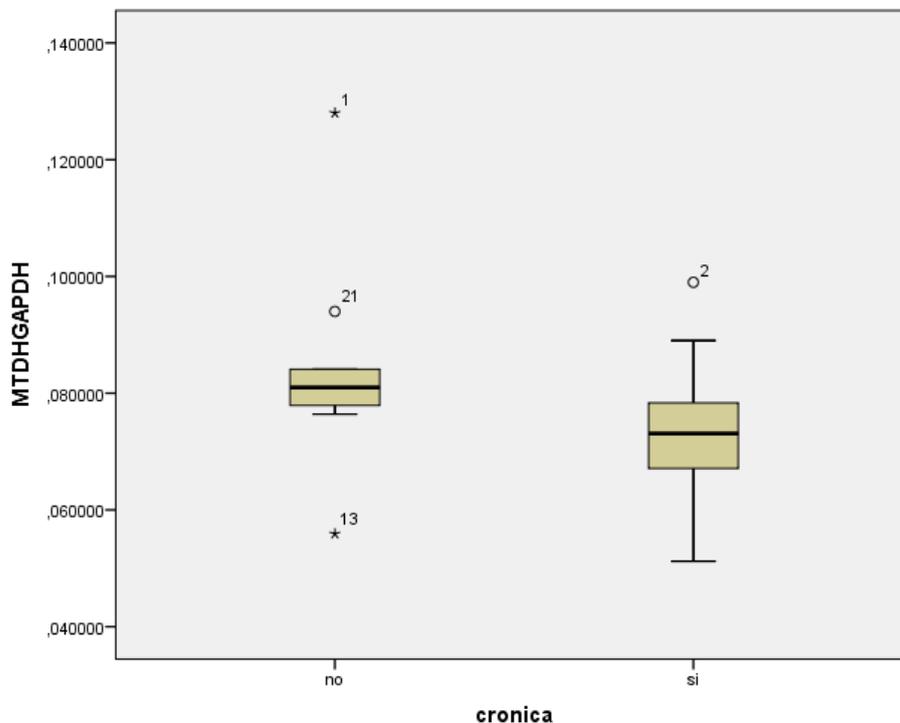


La diferencia de copias TGFBR2/GAPDH entre los 2 grupos NO es significativa

- GEN MTDH



cronica			Estadístico	Error típ.
MTDHGAPDH	no	Media	,08423333	,006411275
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	
		Mediana	,08100000	
		Varianza	,000	
		Desv. típ.	,019233824	
	si	Media	,07328182	,003978895
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior Límite superior	
		Mediana	,07310000	
		Varianza	,000	
		Desv. típ.	,013196501	



Vemos que la diferencia tiende a ser significativa (teniendo en cuenta que la muestra es pequeña)

	MTDHGAPDH
U de Mann-Whitney	28,000
W de Wilcoxon	94,000
Z	-1,633
Sig. asintót. (bilateral)	,102
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,112 ^b

Por lo que puede verse en el diagrama, en este caso sí parece que la distribución sea diferente (la mediana de copias en migrañosos episódicos es superior a los crónicos)

Realizamos posteriormente un **modelo de regresión logística binomial** con el objetivo de evaluar la probabilidad estadística que un conjunto de variables predictivas (migraña crónica o no, edad y sexo) ejercen sobre el número de copias MTDH/GAPDH.

	B	Sig.	OR	I.C. 95% para EXP(B)	
				Inferior	Superior
sexo	1,224	,391	3,399	,207	55,718
edad	-,005	,898	,995	,919	1,077
ratio_MTDH_GAPDH_p50_0.077(1)	2,116	,052	8,297	,980	70,265
Constante	-2,789	,405	,062		

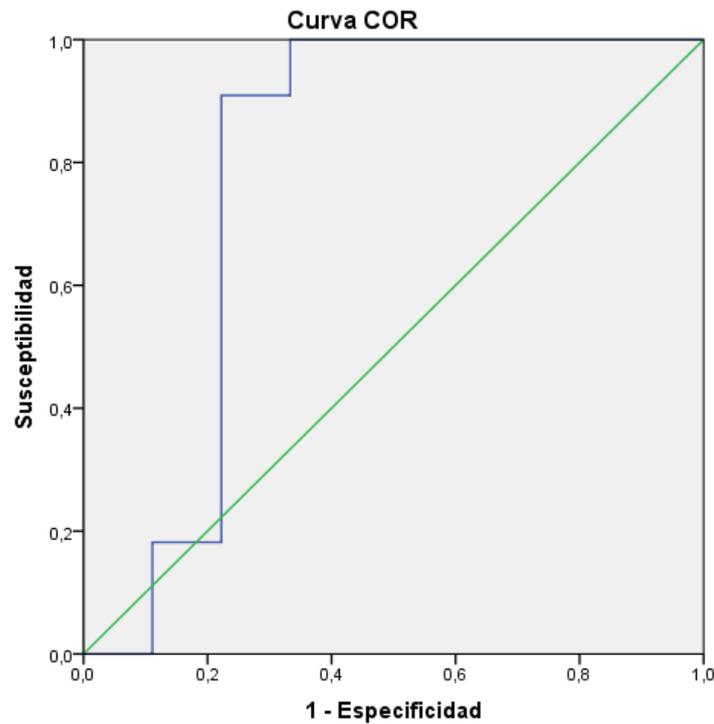
Mientras que en el modelo univariante el ratio MTDH/GAPDH > 0.077 se asocia de forma significativa a la probabilidad de tener migraña episódica comparada con la posibilidad de tener migraña crónica ($p < 0.05$), al ajustar por edad y sexo se pierde esa significación, aunque por poco ($p = 0.052$), mostrando una tendencia clara a comportarse como factor de riesgo de migraña episódica, con un OR de 8.2.

Esto se traduce a que pacientes migrañosos con un número de copias MTDH/GAPDH igual o superior al P50 (=0,077) tienen probabilidad de hasta 8.2 veces mayor de tener una migraña episódica **comparado con los pacientes con migraña crónica**.

Probablemente el limitado tamaño muestral de este estudio explica esta pérdida de significación. Esperamos que aumentando el tamaño muestral el modelo de

regresión pueda demostrar la existencia de una asociación significativa entre los niveles de MTDH/GAPDH y la presencia de migraña episódica.

En un siguiente paso, construimos una función de probabilidad mediante el mismo modelo de regresión. Posteriormente, utilizamos el test del área bajo la curva para evaluar la capacidad de esta función de probabilidad para diagnosticar la presencia de migraña episódica comparada con la crónica.



Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,788	,127	,030	,538	1,000

El área bajo la curva (AUC) es >0,75, por lo que el test se puede considerar como un buen test diagnóstico. Esto nos permite concluir que mediante la medición de la expresión del gen de la metadherina en pacientes migrañosos seremos capaces de clasificarle dentro de los episódicos o crónicos.

DISCUSIÓN

Estos últimos años se ha investigado mucho sobre el componente genético de la migraña, pero el gran problema ha sido casi siempre el mismo, la escasez de resultados amplificables. Tanto en los estudios de ligamiento como en los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) sólo algunos datos han sido reproducidos y, en todo caso, las asociaciones descritas sólo suponen un pequeño aumento del riesgo de migraña. Esto es frustrante para los investigadores, pues los diferentes genes que estudian deben tener un claro papel, al codificar sustancias implicadas en la fisiopatología de la migraña (serotonina, glutamato, dopamina, angiotensina, péptido del gen de la calcitonina, citocinas, estrógenos etc...). La evidencia no es tan fácil de demostrar cómo podría parecer. Afortunadamente gracias a la PCR digital, última tecnología en análisis de PCR, hemos sido capaces de darle una cuantificación a los resultados, con una mayor sensibilidad, resultados más precisos y con una mayor reproductibilidad.

Tras una ardua tarea de pipetaje y amplificación, el laboratorio obtuvo resultados positivos en dos genes. El gen de mayor interés ha sido MTDH, en el que observamos una diferencia de expresión entre los dos grupos de migrañosos, de forma que un aumento de la muestra nos podría aportar una diferencia significativa. Esto nos permitiría etiquetar a pacientes con forma episódica de la migraña y, quizá, ilustrarnos acerca de su pronóstico

En cuanto al gen de la metadherina (MTDH), hasta ahora se conoce bastante acerca de él. Ubicuo en los vertebrados y también llamado EAG1, es un gen implicado en la homeostasis del glutamato aunque también está siendo estudiado por el papel que parece presentar en la carcinogénesis del melanoma, glioblastoma, cáncer de mama, de próstata y hepatocarcinoma (inducido por el oncogén c-Myc, o la infección de HIV-1 o por altas expresiones de TNF- α).

En a lo que migraña se refiere, se ha demostrado que MTDH inhibe la actividad promotora del transportador de aminoácido excitatorio 2 (EAAT2 o SLC1A2). Esta inhibición lleva a un aumento de los niveles de glutamato en la hendidura sináptica, jugando por tanto un rol fundamental en la crisis migrañosa (24). Una

variante/s alélica predispondría a la estimulación de la expresión de la metadherina, promoviendo así la excitotoxicidad del glutamato.

Finalmente faltaría para completar esta investigación el evaluar si existe una variación de los marcadores en los pacientes con migraña crónica tras el paso a migraña episódica a los 3 meses del tratamiento, así como repetir si fuera posible el análisis PCR digital en el resto de ARN de genes que no se logró amplificar, por la posibilidad de un falso negativo debido a la pequeña muestra o a un error en el proceso de análisis de laboratorio.

CONCLUSIONES

1. Mediante la PCR digital, hemos logrado detectar la expresión en sangre periférica de dos de los genes de estudio relacionados con la fisiopatología de migraña (MTDH y TGFBR2)
2. Hemos cuantificado y comparado el número de copias expresadas en leucocitos entre los grupos migraña episódica y crónica, observando que los pacientes con migraña episódica tienden a expresar más el gen de la metadherina (MTDH). Mediante el test de área bajo la curva, hemos confirmado que este test transcriptómico puede constituir una buena prueba diagnóstica para diferenciar la migraña episódica de la crónica. Serán necesarios futuros estudios con un mayor tamaño muestral para confirmar este hallazgo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD et al. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation with age, income, race, and other sociodemographic factors. JAMA 1992; 267: 64-69
- 2) Comité de la clasificación de la cefalea del International Headache Society (IHS) (Marzo 2013). III Edición de la Clasificación Internacional de las Cefaleas ©International Headache Society, 2013, p.23-57
- 3) Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. Brain 1994; 117 (Pt 1): 199-210
- 4) Mauskop A, Altura B, Cracco R. Intravenous magnesium sulphate relieves migraine attacks in patients with low serum ionized magnesium levels: a pilot study. Clinical science 1979; 89: 633-6
- 5) Olesen J, Thomsen L, Iversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. Trends in pharmacological sciences 1994; 15: 149-53
- 6) Ashina M, Lassen LH, Bendtsen L, Jensen RA, Olesen J. Inhibition of nitric oxide synthase has an analgesic effect in chronic pain. Ugeskr Laeger 2000; 162: 171-3.
- 7) Bernasconi A, Andermann F, Bernasconi N, Reutens DC, Dubeau F. Lateralizing value of peri-ictal headache: A study of 100 patients with partial epilepsy. Neurology 2001; 56: 130-2.
- 8) Pascual J. Migraña, serotonina y receptores serotoninérgicos. Neurología 1993; 8 (6): 180-3.
- 9) Silberstein S, Dodick D. Migraine Genetics: a Review. Part I. Headache 2013; 53: 1207-1217.
- 10) 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; 53: 995-999.

- 11) Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A, Bersano A, V, Casari G. A novel mutation in the ATP1A2 gene causes alternating hemiplegia of childhood. *J Med Genet* 2004; 41: 621–628
- 12) Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 2005; 366: 371-7.
- 13) Silberstein S, Dodick D. Migraine genetics: Part II. *Headache* 2013; 53: 1218-29.
- 14) Anttila V, Stefansson H, Calafato MS, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22. *Nat Genet* 2010; 42: 869–873.
- 15) Shin HE, Han SJ, Lee KS, Park JW. Polymorphism of the Glutamate Transporter Protein EAAT2 and Migraine Transformation into Chronic Daily Headache. *J Clin Neurol (Seoul, Korea)* 2011; 7: 143-7
- 16) Shimamoto K, Sakai R, Takaoka K, Yumoto N, Nakajima T, Amara SG, Shigeri Y. Characterization of novel L-threo-beta-benzyloxyaspartate derivatives, potent blockers of the glutamate transporters. *Suntory Institute for Bioorganic Research* 2004; 65: 1008-15.
- 17) Jette NJ, Marson AG, Kadir ZA, Hutton JL. Topiramate for drug-resistant partial epilepsy. *Cochrane Database Syst Rev* 2000: 2 CD001417
- 18) Corominas R, Ribases M, Camiña M et. al. Two-stage case-control association study of dopamine-related genes and migraine. *BMC medical genetics* 2009; 10: 95
- 19) Lesch KP, Balling U, Gross J et al .Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect*, 1994, 95: 157–162
- 20) Schürks M, Bullet R, Rist P, et. al. STin2 VNTR polymorphism in the serotonin transporter gene and migraine: pooled and meta-analyses. *J Headache Pain* 2010; 11: 317-326

21) Plummer PN, Colson NJ, Lewohl JM et al. Significant differences in gene expression of GABA receptors in peripheral blood leukocytes of migraineurs. *Gene* 2011; 490: 32-6.

22) Freilinger T, Anttila V, de Vries B, et. al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nature genetics* 2012; 44: 777-82

23) Law C, et al. Clinical features in a family with an R460H mutation in transforming growth factor β receptor 2 gene. *J Med Genet.* 2006; 43: 908–916.

24) Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, Emdad L, Volsky DJ, Fisher PB. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1/MTDH/LYRIC. *Gene* 2005; 353:8–15.