

EVALUACIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA D COMO BIOMARCADOR DE CEFALEAS



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Curso 2021- 2022

Autora: Lara Arnelas Gil

Tutores: Diego Sánchez Romero, investigador en el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM).

Ángel Luis Guerrero Peral, neurólogo de la Unidad de Cefaleas del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV)

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3.1. Diseño del estudio.....	5
3.2. Muestra.....	5
3.3. Criterios de elegibilidad.....	5
3.4. Variables.....	6
3.5. Protocolo de extracción de las muestras biológicas.....	6
3.6. Protocolo de laboratorio.....	7
3.7. Análisis de datos.....	7
3.8. Aspectos éticos.....	8
4. RESULTADOS.....	9
4.1. Análisis descriptivo de las variables de partida.....	9
4.2. Comparaciones de la variable experimental en los distintos grupos.....	11
4.3. Correlaciones entre la variable experimental y otras variables relevantes.....	13
5. DISCUSIÓN.....	15
6. CONCLUSIONES.....	16
7. BIBLIOGRAFÍA.....	16
8. ANEXOS.....	18
9. AGRADECIMIENTOS.....	22

1. RESUMEN.

INTRODUCCIÓN: La migraña es una cefalea primaria muy prevalente y discapacitante. Su fisiopatología no es aún del todo conocida y se ha hipotetizado una relación con el aumento del estrés oxidativo. Por otro lado, existe una creciente implicación de la Apolipoproteína D (ApoD), una glicoproteína perteneciente a la familia de las lipocalinas, en los cambios fisiopatológicos que engloban al estrés oxidativo y en numerosas patologías del sistema nervioso. En este estudio pretendemos evaluar el papel de la ApoD como posible biomarcador de migraña

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio observacional descriptivo y analítico, de casos y controles, basado en la determinación en suero de Apolipoproteína D en pacientes migrañosos y en individuos sanos a través de la técnica ELISA.

RESULTADOS: Se reclutaron 30 pacientes con migraña y 17 controles. No se apreció diferencia en los niveles de ApoD entre ambas poblaciones.

CONCLUSIONES: A pesar del conocimiento teórico previo sobre esta relación, los resultados obtenidos rechazan la hipótesis planteada de que los pacientes migrañosos tendrían niveles de ApoD más elevados que los pacientes no migrañosos. Tras el análisis de los datos se observa la limitación del tamaño y características de la muestra poblacional, por lo que este estudio servirá como preámbulo de futuras investigaciones sobre la relación entre ApoD y la migraña.

Palabras clave: Apolipoproteína D. Migraña episódica. Migraña crónica. Estrés oxidativo. Hiperlipidemia

2. INTRODUCCIÓN.

En España, la cefalea constituye el primer motivo de consulta de los pacientes que solicitan asistencia ambulatoria en neurología y, dentro de ellas, la migraña ocupa el primer puesto en el diagnóstico (1). La prevalencia de la migraña oscila entre el 10-16% con un predominio en mujeres de 2-3:1 frente a varones (2). La repercusión social y económica que provoca la migraña viene determinada por una importante limitación en la actividad de los pacientes que la sufren, provocando un gran impacto en el funcionamiento diario del paciente, tanto en aspectos emocionales, como familiares, laborales, económicos y sociales (3). Según los informes del *Global Burden of Disease Study* (GBD) del 2019 sobre la carga que las enfermedades suponen en el mundo, la

migraña ocupa segundo puesto en cuando a años vividos con discapacidad (AVD) en ambos sexos y el primer puesto en mujeres (4).

El diagnóstico de la migraña es clínico y se alcanza con la anamnesis, aplicándose los criterios de la clasificación internacional de cefaleas (CIC) del Comité de Clasificación de la *International Headache Society* (IHS) (5)

Según la III edición de la CIC, actualmente vigente, la migraña se define por la existencia de ataques de cefalea de entre 4 y 72 horas de duración en los que el dolor es generalmente unilateral, pulsátil y de una intensidad moderada o grave; el dolor se agrava con las actividades físicas hasta incluso impedir su realización y se acompaña de algún síntoma como náuseas/vómitos o fotofobia/fonofobia. La CIC define como migraña crónica la presencia de cefalea 15 o más días al mes durante más de tres meses, de los cuáles al menos 8 días la cefalea tiene características de migraña [Anexo 1]. Por oposición, se define migraña episódica como la presencia de cefalea menos de 15 días al mes.

La migraña, y aunque lo que sabemos de su fisiopatología no es aún todo, se trata de un trastorno neurovascular en el que un cerebro desadaptado, responde con dolor a cambios tanto internos como externos en el entorno del paciente. Dentro de los internos puede estar el ciclo menstrual o el ritmo de sueño y dentro de los externos ciertos alimentos o cambios climatológicos, así como stress y trastornos del ánimo.

Un fenómeno que se ha propuesto como parte de los mecanismos implicados en la migraña es el estrés oxidativo. Se ha descrito un aumento del estrés oxidativo en relación con varios de los desencadenantes alimentarios de un ataque de migraña, como el alcohol, glutamato monosódico o aspartamo, y en otros como el ayuno, cambios del ritmo de sueño, cambios de los niveles de estrógeno en mujeres, o el estrés psicosocial (6).

El estrés oxidativo surge debido a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su eliminación, a favor de la primera. Este desequilibrio puede dañar membranas lipídicas, enzimas, y proteínas estructurales, favoreciendo un gran número de enfermedades (7).

Se ha descrito un incremento del daño oxidativo en las principales biomoléculas de los pacientes migrañosos como en el DNA (8), en proteínas (9), o en lípidos (10). Incluso existen trabajos que sugieren que el umbral de padecer migraña en un individuo depende del equilibrio entre la activación/inhibición del sistema nervioso central a través de la fosforilación oxidativa (11)

Las células endoteliales cerebrales tienen características que las diferencian del resto de células endoteliales. Por un lado, presentan uniones intercelulares estrechas que evitan el paso transcápsular de moléculas polares (como iones y proteínas) y, por

otro lado, carecen de fenestraciones y vesículas pinocíticas. Como resultado, conforman una barrera celular entre la sangre y el espacio intersticial conocida como la barrera hematoencefálica (12).

El endotelio vascular tiene múltiples funciones, dentro de las cuales su alteración podría contribuir en la fisiopatología de la migraña. Dicho endotelio está involucrado en el control del tono vascular, la hemostasia, la fibrinólisis, la inflamación y permeabilidad vascular.

La disfunción endotelial está mediada por estrés oxidativo y se caracteriza por la disminución de la capacidad vasodilatadora e incremento de los factores vasoconstrictores derivados del endotelio, conduciendo al deterioro de la función vasodilatadora endotelio dependiente.

Estos cambios del diámetro vascular durante los ataques de migraña y la observación de ciertas anomalías en el control del tono vascular han permitido establecer la hipótesis sobre la posible participación del endotelio en esta patología (13).

La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las lipocalinas, relacionadas con el transporte de moléculas hidrofóbicas de bajo peso molecular. La ApoD se presenta en la mayoría de los fluidos corporales y tejidos de los mamíferos, entre los que destaca el cerebro. Hoy en día no está muy claro su papel fisiológico y se postula que sus funciones varían según el tejido en el que se encuentre y de las condiciones de éste (14).

Dentro de los vasos sanguíneos, la ApoD se expresa durante el desarrollo predominantemente en las células que rodean al endotelio. Su expresión, en adultos, se localiza en vasos sanguíneos maduros y en las lesiones ateromatosas. Dentro de sus funciones se incluye la inhibición de la proliferación del músculo liso vascular asociado al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés). También se ha demostrado que PDGF y ApoD actúan sinérgicamente para mediar la migración del músculo liso vascular.

Existe una creciente implicación de la ApoD en diversas patologías del sistema nervioso, en el estrés oxidativo y en la función endotelial (15). Por otro lado, se ha demostrado una asociación entre las células gliales y los cuerpos celulares de las fibras trigeminales de tal forma que la interacción entre ambas se asocia a la propagación del dolor en migraña (16). Ante una situación de estrés oxidativo, la glía aumenta la producción de ApoD y, además, se liberan otros mediadores inflamatorios que terminan por establecer una comunicación neuronal-glial involucrada en el desarrollo de la sensibilización periférica dentro del ganglio del trigémino, jugando un papel importante en el inicio de la migraña.

HIPÓTESIS

La ApoD podría ser un biomarcador de migraña.

OBJETIVOS

Cuantificar niveles de expresión de Apolipoproteína D en suero en mujeres con migraña y en mujeres controles.

Establecer la relación de esos niveles con diferentes situaciones clínicas de migraña

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Diseño del estudio.

Estudio observacional descriptivo y analítico, de casos y controles, basado en la determinación en suero de Apolipoproteína D en pacientes migrañosos y en individuos sanos. Se han seguido los criterios STROBE para estudios observacionales.

3.2. Muestra.

La población de estudios fueron mujeres residentes en Valladolid, que padezcan migraña (para formar el grupo caso) o que no la padezcan (para formar el grupo control), con una edad comprendida entre los 18 y 45 años.

Los pacientes fueron reclutados entre los atendidos en la Unidad de Cefaleas del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y los controles entre el entorno social de la investigadora de este trabajo

No se realizó un cálculo formal del tamaño muestral. Dada la novedad de la hipótesis se planteó este estudio como exploratorio.

3.3. Criterios de Elegibilidad.

Los pacientes migrañosos se incluyen de acuerdo con los siguientes

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Diagnóstico de migraña de acuerdo con la versión vigente de la Clasificación Internacional de Cefaleas
- Pacientes de sexo femenino con edad comprendida entre los 18 y 45 años.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Cefaleas distintas a migraña aparte de la cefalea tensional episódica infrecuente.
- Enfermedad neurológica grave que dificulte la comunicación, retraso mental (cociente intelectual <70), trastorno psiquiátrico importante como depresión mayor o trastorno bipolar según DSM-5, abuso de sustancias.
- Embarazo o lactancia.

- Índice de masa corporal (IMC) menor de 18 o mayor de 30.
- Patología cardiovascular (hipertensión, diabetes, ictus, tabaquismo activo).
- Enfermedades infecciosas o inflamatorias en el mes previo a la extracción de la muestra o patologías inflamatorias activas (enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, artritis reumatoide, síndromes de dolor crónico como artropatías, discopatías axiales o fibromialgia).
- Enfermedades autoinmunes (hipotiroidismo, trastornos neuromusculares, epilepsia, enfermedades hepáticas o renales, trastornos gastrointestinales como úlcera péptica o duodenal, dispepsia, acidez o hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos).

Los controles fueron confirmados como tal en una entrevista clínica por parte de los investigadores del proyecto. Por lo demás los criterios de inclusión y exclusión son los mismos que los de los pacientes migrañosos.

3.4. Variables.

En la entrevista realizada por el equipo de investigadores del estudio, se recogen las siguientes variables de interés:

Tabla 2. Variables de partida de interés

<i>Demográficas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Edad</i> • <i>Sexo</i>
<i>Clínicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Niveles elevados de lípidos en sangre • Familiares con niveles elevados de lípidos en sangre
<i>Temporales</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas de cefalea al mes • Síntomas de cefalea tipo migrañoso al mes • Años con diagnóstico de cefalea migrañosa
<i>Etiológicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Migraña episódica • Migraña crónica
<i>Terapéuticas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Abuso de analgésicos

3.5. Protocolo de extracción de las muestras biológicas.

Se recogieron muestras de sangre de los participantes de forma programada en la Unidad de Cefaleas del Edificio Rondilla del HCUV, teniendo en cuenta que los sujetos no podían haber presentado un episodio de cefalea migrañosa en los tres días previos.

Una vez realizada la extracción sanguínea por venopunción antebraquial, se emplean tubos de recogida con gelosa y tubos con heparina de litio para separar suero y plasma respectivamente. Dichos tubos se codifican de forma anónima creando una base de datos. Tras esto, se centrifugan (3500 rpm, 4°C), se alícuota el suero, el plasma y las células y se almacenan a -20°C en el propio Edificio Rondilla hasta su posterior análisis en el laboratorio.

3.6. Protocolo de laboratorio.

Las muestras se transportaron en hielo seco hasta el Instituto de Biología Molecular (IBGM) de Valladolid, donde se mantuvieron a -20°C hasta el día del procesamiento. Dicho día, se descongelaron en frigorífico a 4°C y se centrifugaron durante 5 minutos a 16.000 g.

Para la determinación de ApoD en el suero de las pacientes migrañosas y los controles, se utilizó la técnica de ELISA (Human Apolipoprotein D ELISAPRO, Mabtech, Suecia). Esta técnica permite la cuantificación basada en estándares internos con concentraciones conocidas de ApoD humana purificada. Los niveles normales de concentración de ApoD plasmático se esperan en torno a 130 mg/L.

Se emplearon 10µl de cada muestra de suero de cada sujeto para hacer una dilución 1:20.000. Se pipetearon en cada pocillo de la placa de Elisa 100µl de las muestras diluidas por duplicado para cada sujeto. A la placa también se añadieron 100µl de la preparación estándar de ApoD en ocho concentraciones diferentes, y también por duplicado para elaborar la curva patrón [Anexo 2]. Se procesaron siguiendo el protocolo del kit [Anexo 3] y, tras finalizar el tiempo de incubación con anticuerpos específicos frente a ApoD, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (SOFTmax Pro; Molecular Devices) disponible en el centro. También se midió la absorbancia a 650 nm para poder corregir por sustracción la señal de fondo.

Una vez estimada la concentración plasmática de ApoD en los grupos de pacientes y los controles sanos, se evaluó si había diferencias entre dichos niveles que pudieran estar relacionadas con el hecho de padecer migraña o la situación clínica de la migraña.

3.7. Análisis de datos.

Una vez recogidas las variables de interés de los sujetos de la muestra, se realizó un análisis descriptivo y analítico de ellas. Toda la información, tanto clínica como analítica, se recogió en una base de datos anonimizada y se almacena en el software RedCap. Se utilizó el paquete estadístico R commander versión 4.2 para Windows junto con

Microsoft Excel versión 16.61 para realizar todos los análisis estadísticos y su representación gráfica.

Para el análisis estadístico se recodificaron las siguientes variables: los sujetos que padecen migraña (tanto episódica como crónica) se agruparon como “CASOS” y aquellos que no la padecen, como “CONTROLES”; la presencia de niveles altos de colesterol en sangre se recodificó como “Antecedentes personales de hiperlipidemia SI/NO” y “Antecedentes familiares de hiperlipidemia SI/NO”

Una vez codificadas todas las variables, por un lado, se estudió el tipo de distribución que presentan y se evaluó numéricamente su ajuste a una distribución normal usando el test de Shapiro-Wilk (dado que el tamaño muestral es menor de 50) y de forma gráfica mediante una comparación de cuantiles. También se comprobó la homocedasticidad de la muestra poblacional con el Test de Levene. Por otro lado, se hizo un análisis univariado de cada una de las variables: las variables cuantitativas que siguen una distribución normal se presentan como la media \pm desviación estándar, y en caso de no normalidad se presentan como mediana y rango intercuartílico (RIC). Las variables cualitativas se expresan como frecuencia y porcentaje.

En este estudio que tiene como objetivo principal evaluar la utilidad de la Apolipoproteína D como biomarcador de migraña, se define como hipótesis nula que los sujetos con niveles altos de ApoD no presentan menos síntomas migrañosos; y como hipótesis alternativa, se plantea que los sujetos con niveles altos de ApoD presentan menos síntomas migrañosos.

Además del análisis descrito previamente, y como objetivos secundarios en esta ocasión, se evalúa la relación de los niveles de Apolipoproteína D con el resto de las variables que son relevantes desde el punto de vista clínico para estudiar su posible interacción.

Para la valoración de la relación entre variables numéricas, se usa un modelo de regresión lineal; mientras que para valorar la relación entre variables numéricas y categóricas se usa el Test T-student para variables independientes.

Asumimos la significación estadística con valores de $p < 0,05$, de forma bilateral.

3.8. Aspectos éticos

La ejecución de este proyecto cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIm) Valladolid Este ((PI: 22-2551 TFG), y se utilizó un formulario de consentimiento informado generado ad hoc para este proyecto.

El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

El estudio se ha desarrollado en concordancia con la normativa vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

En todo momento se ha velado por el anonimato de los participantes, tratándose la información obtenida de manera confidencial conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos 3/2018.

4. RESULTADOS.

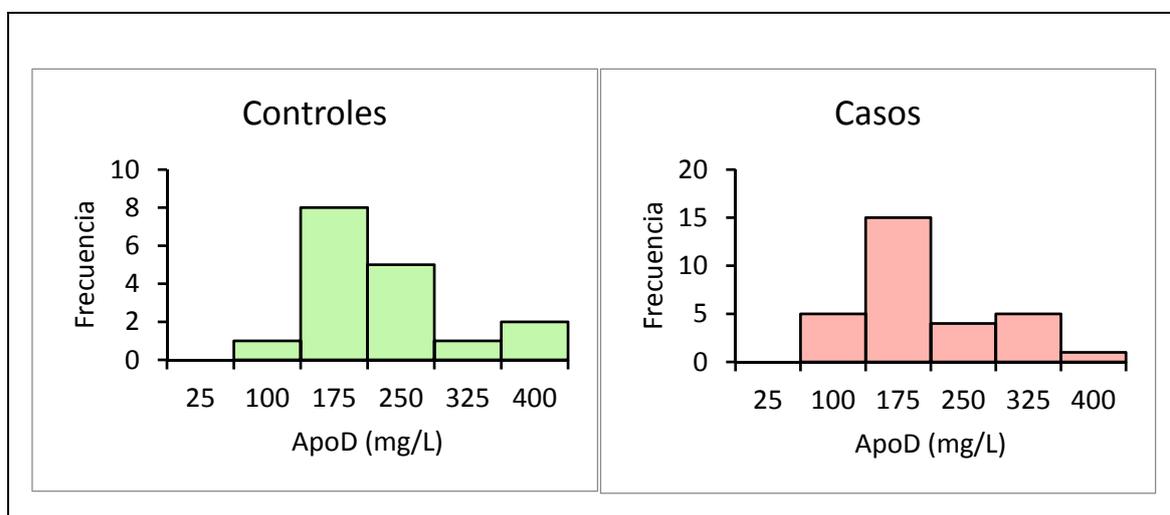
Desde octubre de 2021 hasta mayo de 2022 fueron reclutados un total de 47 sujetos (n=47) según los criterios de selección definidos anteriormente, clasificados tras la entrevista clínica como 30 casos (n=30) y 17 controles (n=17).

Tras la extracción, procesamiento y valoración de la calidad de las muestras, fueron todas incluidas en el análisis de ELISA.

4.1. Análisis descriptivo de las variables de partida.

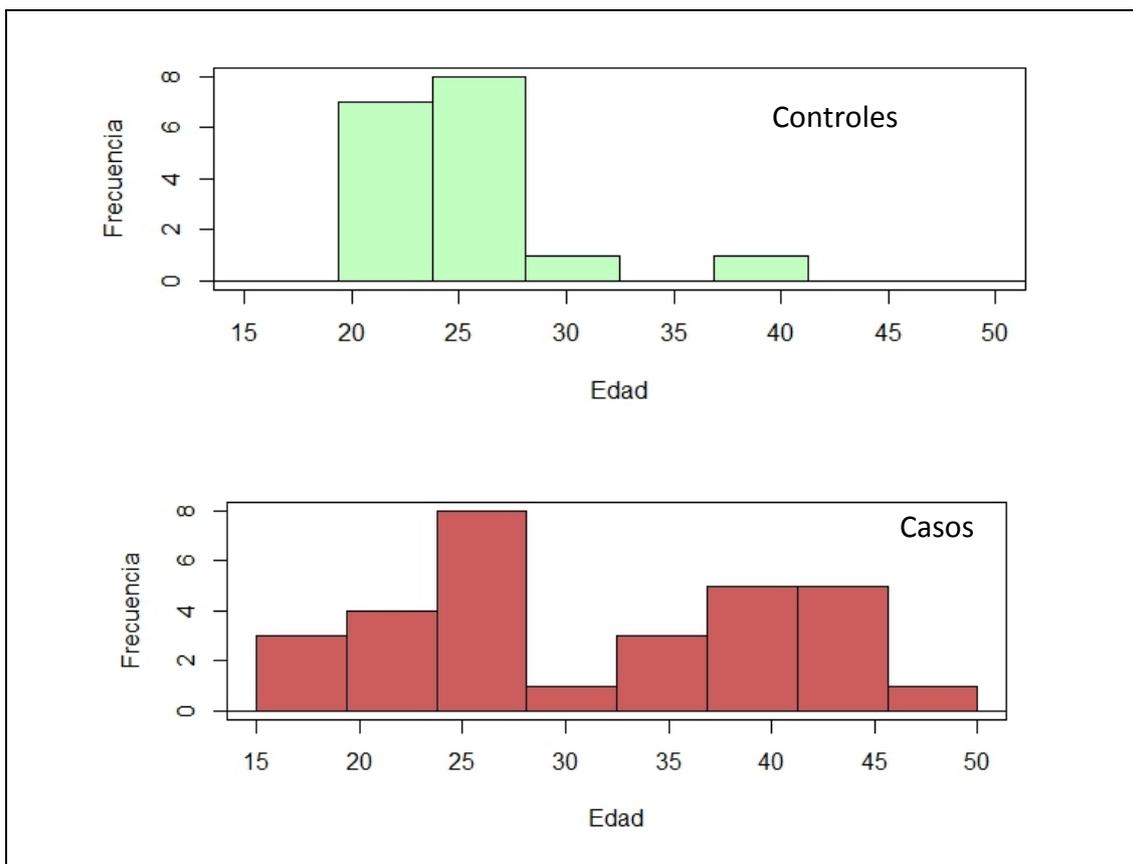
Al analizar la variable “Nivel de ApoD (mg/L)” en la muestra poblacional, se obtiene un valor de $176,03 \pm 83,50$ de forma global (Valores normales: ~ 130 mg/L), mientras que de forma específica en el grupo control es $191,31 \pm 83,19$ y en el grupo de casos es de $167,38 \pm 83,83$. Los histogramas de cada grupo (Figura 1) muestran leves diferencias en su distribución.

Figura 1. Histogramas de la distribución del nivel de ApoD en los grupos de controles (verde) y casos (rojo)



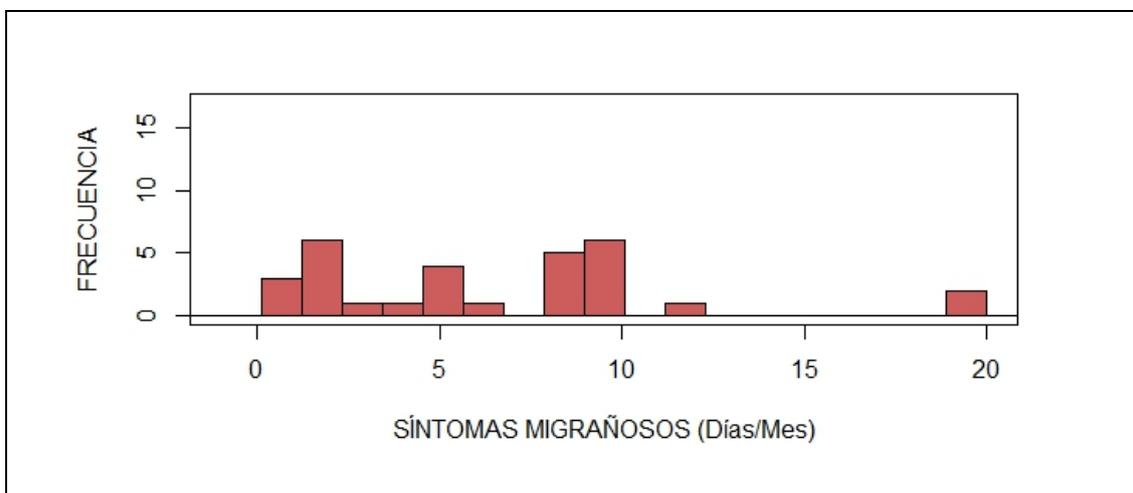
Con respecto a la variable “Edad”, se obtiene una distribución con mediana y rango intercuartílico (RIC) de 24(23-36,5), siendo 24(23-25) para el grupo control y 27,5(24-39,75) para el grupo de casos, siendo los dos grupos homogéneos (Figura 2).

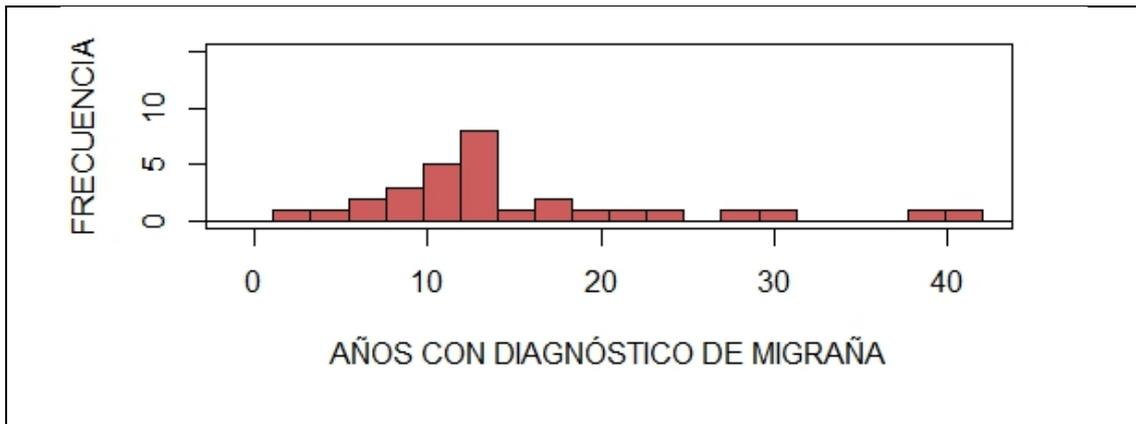
Figura 2. Histogramas de la distribución de la variable “Edad” en los grupos de controles (verde) y casos (rojo)



En el grupo de casos de la muestra poblacional, la variable “Síntomas migrañosos (Días/Mes)” muestra una distribución con mediana y RIC de 5,5(2-10), y para la variable “Años con diagnóstico de migraña” es de 14(10-18) (Figura3).

Figura 3. Histogramas con la distribución de las variables “Síntomas migrañosos (Días/Mes)” y “Años con diagnóstico de migraña” en el grupo de casos





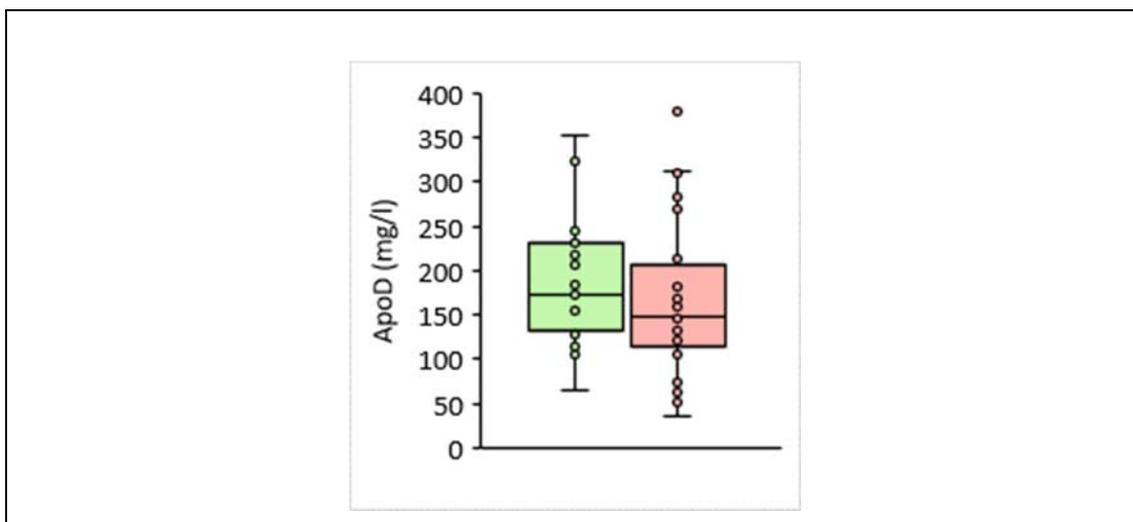
Análisis de la distribución de la variable experimental “niveles plasmáticos de ApoD).

Se toma como hipótesis nula (H_0) que la variable “Nivel de ApoD” sigue una distribución normal y como hipótesis alternativa (H_1) que ésta no cumple una distribución normal. Para evaluar numéricamente el ajuste a dicha distribución, se utiliza el Test de Shapiro-Wilk y se obtiene un valor estadístico de $W=0,956$ y un $p=0,079$. Por tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula. La representación gráfica de comparación de cuantiles se muestra en la Figura 1 y corrobora la asunción de que el nivel de ApoD sigue una distribución normal. Para evaluar la homocedasticidad del nivel de ApoD se utiliza el Test de Levene, cuyo resultado ($p=0,869$) indica que no se rechaza la hipótesis nula de igualdad de varianzas en la muestra poblacional. Con estos resultados es razonable usar métodos paramétricos para las comparaciones entre grupos

4.2. Comparaciones de la variable experimental en los distintos grupos.

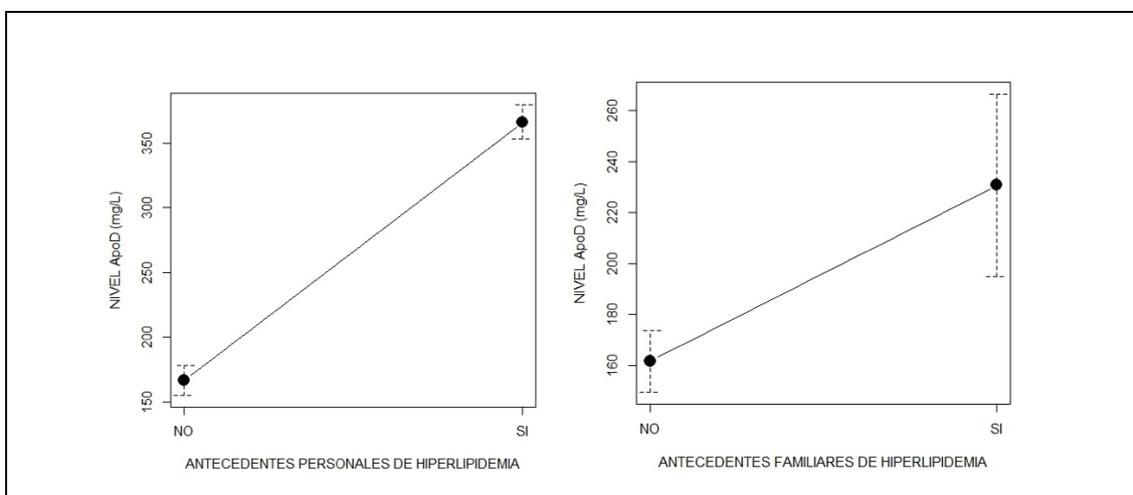
En primer lugar, en lo que concierne al objetivo principal de este estudio se compara el nivel de ApoD en cada grupo de sujetos (caso/control), con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula planteada previamente. Se lleva a cabo un análisis mediante Test t-Student para variables independientes, en el que se obtiene un valor de $t= -0,9449$ ($p =0,35$), IC95% [-75,42 – 27,56]. A la vista de los resultados (Figura 4) no se rechaza la hipótesis nula y, por tanto, con los datos conseguidos en este proyecto no podemos proponer el nivel de ApoD en plasma como biomarcador de la migraña.

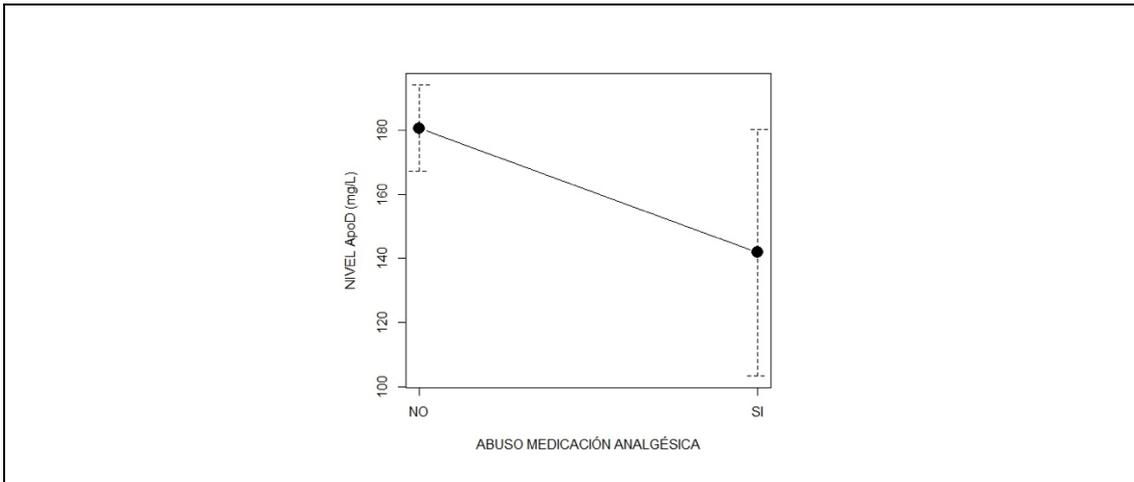
Figura 4. Gráfico de cajas con la distribución del nivel de ApoD (mg/L) en el grupo de controles (verde) y casos (rojo)



Como objetivo secundario, se exploran también las relaciones entre el nivel de ApoD y las variables recodificadas como “Antecedentes personales o familiares de hipercolesterolemia” y “Abuso de medicación analgésica”. Se realizan los correspondientes Test t-Student para variables independientes, obteniendo valores de $t = -11.415$ ($p=0,001$), IC95% [-254,95/-143,70] para la combinación con antecedentes personales de hiperlipidemia, y $t = -18331$ ($p=0,097$), IC95% [-153,31/15,02] en el caso de antecedentes familiares y, por último, $t=0,949$ ($p=0,38$), IC95% [-65,79/143,12] para la variable abuso de medicación analgésica (Figura 5). De estos resultados se puede deducir que los niveles plasmáticos de ApoD sí se correlacionan con la existencia de antecedentes de hipercolesterolemia.

Figura 5. Diagrama de medias de las variables “Antecedentes personales de hiperlipemia”, “Antecedentes familiares de hiperlipemia” y “Abuso de medicación analgésica”.



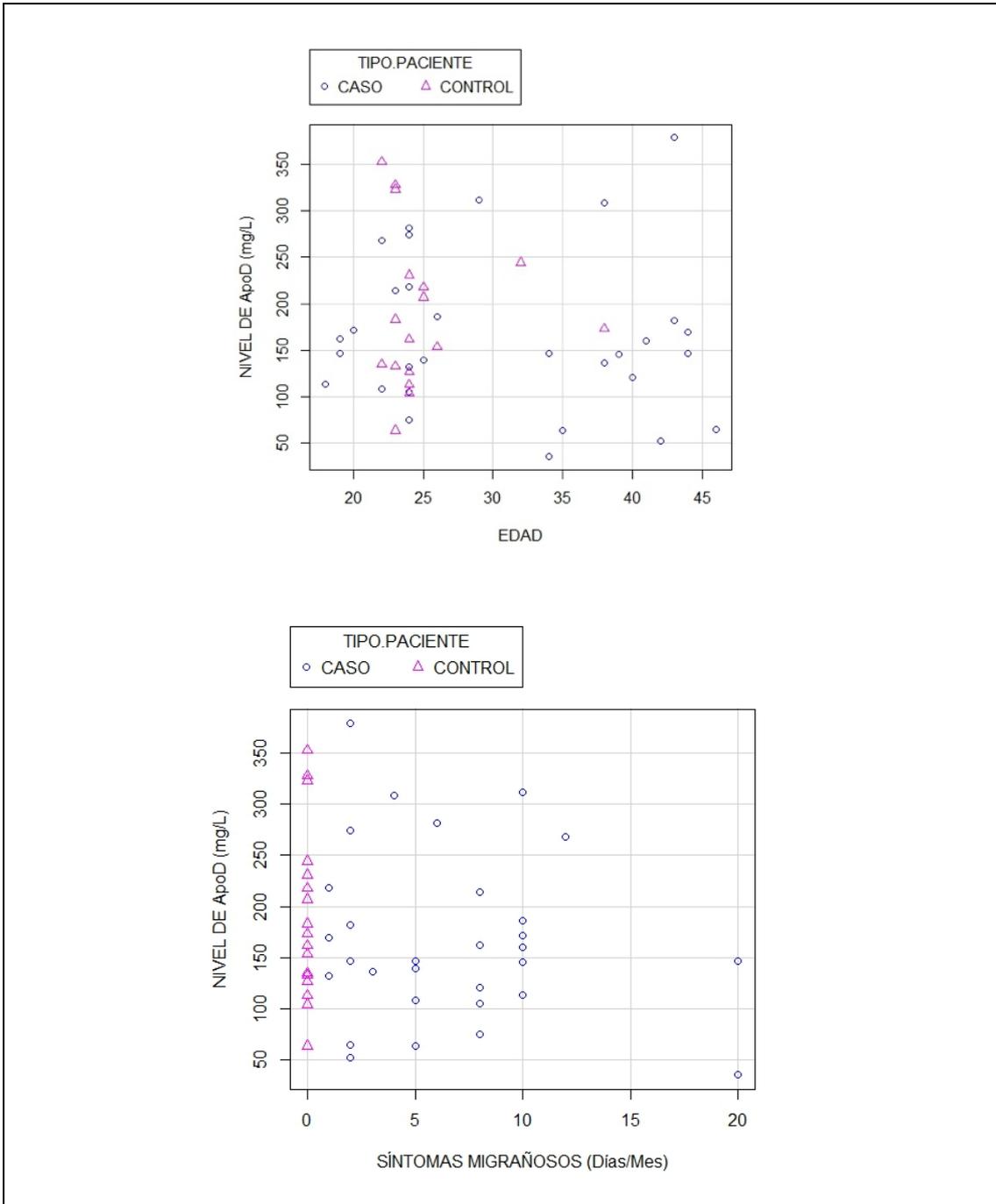


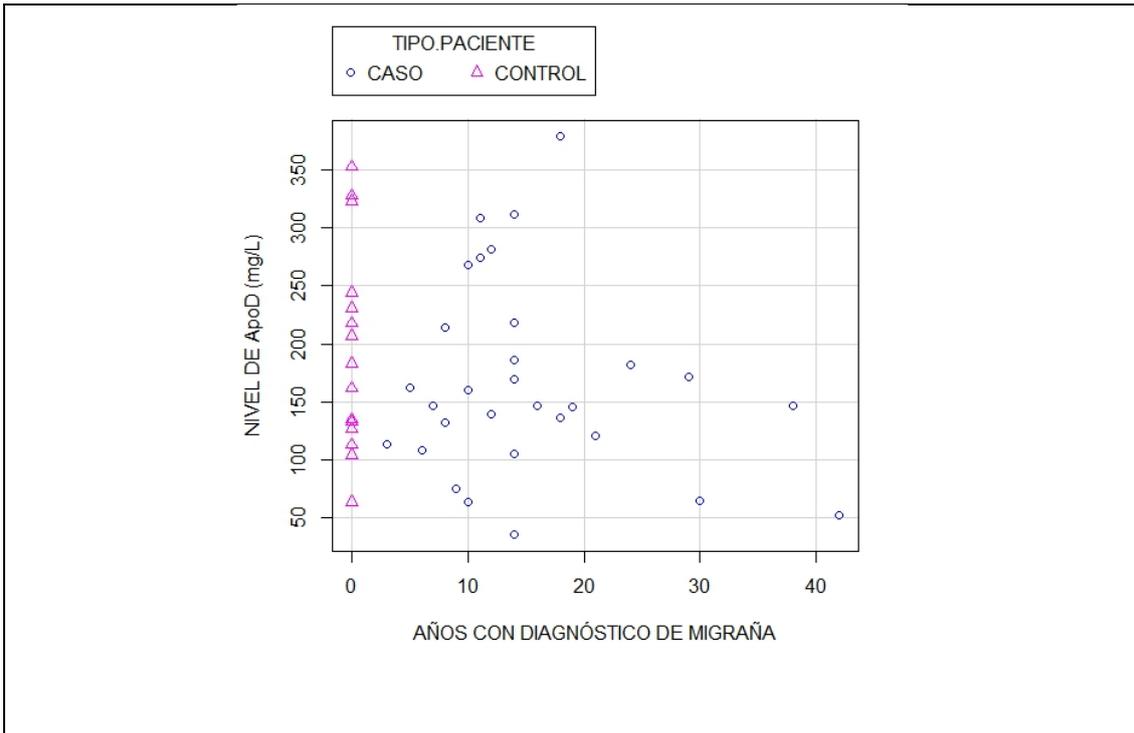
El nivel de ApoD tiene una distribución de $167,588 \pm 74,609$ en los individuos sin antecedentes personales de hiperlipidemia ($n=45$) y de $366 \pm 18,707$ en los individuos con antecedentes personales de hiperlipidemia ($n=2$). El nivel de ApoD tiene una distribución de $163,078 \pm 72,682$ en los individuos sin antecedentes familiares de hiperlipidemia ($n=38$) y de $230 \pm 107,224$ en los individuos con antecedentes familiares de hiperlipidemia ($n=9$). El nivel de ApoD tiene una distribución de $180,099 \pm 83,331$ en los individuos que no abusan de medicación analgésica ($n=42$) y de $141,907 \pm 85,926$ en aquellos que si abusan de medicación analgésica ($n=5$).

4.3. Correlaciones entre la variable experimental y otras variables relevantes.

Se explora la correlación entre los niveles de ApoD y las variables “Edad”, “Síntomas migrañosos” y “Años con diagnóstico de migraña”. Dado que no cumplen una distribución normal estas tres últimas variables, se emplea el coeficiente de correlación de Spearman, sin encontrar correlaciones significativas. El coeficiente rho nos muestra que la relación es escasa o nula ($\rho_{\text{ApoD/Edad}}=-0,08$; $\rho_{\text{ApoD/Síntomas migrañosos}}=-0,149$; $\rho_{\text{ApoD/Años Diagnóstico}}=-0,125$) (Figura 6).

Figura 6. Diagramas de dispersión de las variables "Edad", "Síntomas migrañosos (Días/Mes)" y "Años con diagnóstico de migrañas" en correlación con el Nivel de ApoD (mg/L)





5. DISCUSIÓN.

El diseño de este estudio trata de explicar el comportamiento en la expresión de la ApoD en respuesta a la presencia de migraña. No hemos observado en este trabajo que los niveles de ApoD se relacionen con el hecho de padecer migraña en comparación con un grupo control

En lo que respecta al análisis del resto de variables de partida (edad, antecedentes personales/familiares de hiperlipidemia, años con diagnóstico de migraña, días al mes con síntomas migrañosos y abuso de medicación analgésica) con el fin de poder correlacionar aspectos clínicos relevantes, tampoco se ha obtenido un resultado que nos permita establecer una relación significativa, salvo la relación de altos niveles de ApoD en sujetos con hipercolesterolemia.

Las principales limitaciones de este trabajo son el bajo tamaño muestral global, especialmente el grupo control (n=17), y la poca homogeneidad en lo que respecta a la variable edad, ya que el resto de las variables clínicas (como el nivel de lípidos en sangre o los años con diagnóstico de migraña) se pueden ver influidas por ésta de forma indirecta.

Las razones de este resultado negativo pueden ser:

- No existe una influencia del estrés oxidativo en la aparición de migraña

- El stress oxidativo puede relacionarse más con la situación clínica de migraña o los diferentes desencadenantes de los ataques de migraña o los precipitantes de cronificación de la misma que con el hecho de padecer una migraña
- El nivel en plasma de ApoD no es la manera adecuada de explorar el stress oxidativo en migraña.
- El tamaño muestral de este trabajo es insuficiente para mostrar diferencias

En los próximos meses el grupo de investigación buscará el reclutamiento de nuevos sujetos que aporten a la muestra una mayor heterogeneidad en cada una de las variables de la investigación para poder evaluar el papel de la Apolipoproteína D como biomarcador de cefaleas.

6. CONCLUSIONES.

La Apolipoproteína D sérica no se comporta como biomarcador de migraña, en la población estudiada.

No se han podido establecer tampoco relaciones significativas con el resto de las variables de partida que a priori parecían tener una relación positiva, a excepción de la relación entre niveles altos de ApoD en pacientes con hipercolesterolemia.

Con el fin de continuar indagando en la fisiopatología de la ApoD, se utilizará este estudio como preámbulo de una nueva investigación con mayor y más heterogénea muestra poblacional que permita plantear y contrastar nuevas hipótesis: 1) Evaluar el comportamiento de la ApoD en población masculina migrañosa y sana. 2) Determinar si existen variaciones en el nivel de ApoD en el momento de crisis migrañosa con respecto al “nivel basal” del sujeto 3) Determinar si existe una curva patrón en los niveles de ApoD tras un ataque de migraña.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Guerrero AL, Rojo E, Herrero S, Neri MJ, Bautista L, Peñas ML, et al. Characteristics of the first 1000 headaches in an outpatient headache clinic registry. *Headache*. 2011; 51:226-231.
2. Fernández de las Peñas C, Hernández-Barrera V, Carrasco-Garrido P et al. Population-based study of migraine in Spanish adults: Relation to socio-demographic factors, lifestyle and comorbidity with other conditions. *J Headache Pain* 2010; 11:97-104.
3. Bloudek LM, Stokes M, Buse DC et al. Cost of health care for patients with migraine in Five European countries: Results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *J Headache Pain* 2012; 13:361-378.

4. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2020; 396: 1204-1222
5. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018; 38:1-211.
6. Kelman L. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia*. 2007; 27:394- 402.
7. Sies H, Cardenas E. Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985; 311:617-631
8. Geyik S, Altunışık E, Neyal AM, Taysi S. Oxidative stress and DNA damage in patients with migraine. *J Headache Pain* 2016; 17:10
9. Eren Y, Dirik E, Neşelioğlu S, Erel Ö. Oxidative stress and decreased thiol level in patients with migraine: cross-sectional study. *Acta Neurol Belg* 2015; 115(4): 643-9.
10. Ciancarelli I, Tozzi-Ciancarelli MG, Di Massimo C, Marini C, Carolei A. Urinary nitric oxide metabolites and lipid peroxidation by-products in migraine. *Cephalalgia* 2003; 23(1): 39-42.
11. Yilmaz N, Aydin O, Yegin A, Tiltak A, Eren E. Increased levels of total oxidant status and decreased activity of arylesterase in migraineurs. *Clin Biochem* 2011; 44 (10-11): 832-7.
12. Tieljten GE. Migraine as a systemic vasculopathy. *Cephalalgia* 2009; 29:989-996.
13. Schwedt T. Endothelial Dysfunction in Migraine. *Cephalalgia*. 2009;29(9):997-1002.
14. Sanchez D, Ganfornina MD. The lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. *Front. Physiol*. 2021; (12): 1587
15. Navarro-Incio AM, Tolivia-Fernández J. Implicación de la apolipoproteína D en las patologías del Sistema nervioso. *Rev Neurolol* 2004; 38 (12): 1166-1175
16. Yilmaz N, Aydin O, Yegin A, Tiltak A, Eren E. Increased levels of total oxidant status and decreased activity of arylesterase in migraineurs. *Clin Biochem* 2011; 44 (10-11): 832-7.

8. ANEXOS.

Anexo 1. Criterios diagnósticos de la clasificación internacional de cefaleas (CIC) del Comité de Clasificación de la International Headache Society (IHS)

A. Al menos cinco crisis que cumplan los criterios B-D.

Si se cumplen los criterios restantes, pero son menos de cinco crisis, debería codificarse como probable migraña.

B. Duración de las crisis de 4-72 horas.

Se refiere a las crisis no tratadas o a las tratadas sin éxito. Si se queda dormido y despierta sin cefalea, la duración se contabilizará hasta el despertar. Es importante tener en cuenta que las crisis en los niños y adolescentes pueden durar menos de 4 horas (rango 2-72 horas)

C. La cefalea tiene al menos dos de las siguientes características:

- Localización unilateral. El 30-40% de las crisis de migraña cursa con dolor bilateral. En muchos casos, el dolor se inicia en un hemicráneo y durante a crisis se hace bilateral. De hecho, en niños y adolescentes es más a menudo bilateral. En los casos con dolor unilateral, es típico que el dolor cambie de lado en las diferentes crisis, aunque el 10% de las cefaleas estrictamente unilaterales corresponden a migraña. En los casos en que el dolor sea estrictamente unilateral, se debe descartar una cefalea secundaria, fundamentalmente cefalea cervicogénica, o alguna de las cefaleas primarias, centrándose en el grupo de las cefaleas trigémino-autonómicas.
- Calidad pulsátil. Más del 50% de los pacientes con migraña presenta dolor no pulsátil. Muy característicamente la calidad del dolor cambia durante las crisis, siendo pulsátil solo en el acmé o con las maniobras de Valsalva. Se ha de considerar que se cumple este criterio, aunque el dolor sea pulsátil de forma discontinua dentro de la crisis de migraña.
- Intensidad moderada-grave. El dolor interfiere (moderado) o impide (grave) las actividades habituales.
- Se agrava con las actividades físicas habituales o impide la realización de estas (por ejemplo, caminar o subir escaleras). Este es uno de los síntomas más específicos y sensibles para el diagnóstico de la migraña. El agravamiento por el simple movimiento de la cabeza (maniobra del traqueteo de Titus) es un síntoma de gran sensibilidad.

D. Al menos uno de los siguientes síntomas durante la cefalea:

- Náuseas y/o vómitos. Es importante diferenciar la náusea de la anorexia, síntoma mucho más inespecífico. Por otro lado, delimitar si las náuseas son secundarias a la medicación sintomática o a la propia crisis de migraña puede ser complicado si las náuseas no estaban presentes antes del tratamiento.
 - Fotofobia y fonofobia. Estos síntomas están presentes en más del 80% de las crisis de migraña. También es frecuente la osmofobia.
-

E. No se encuentran indicios en la historia clínica ni en el examen físico de que los síntomas puedan atribuirse a otra causa o sugieran más otro diagnóstico de la IHS.

En concreto, no debe haber síntomas de alarma y el examen físico, sistémico y neurológico ha de ser normal.

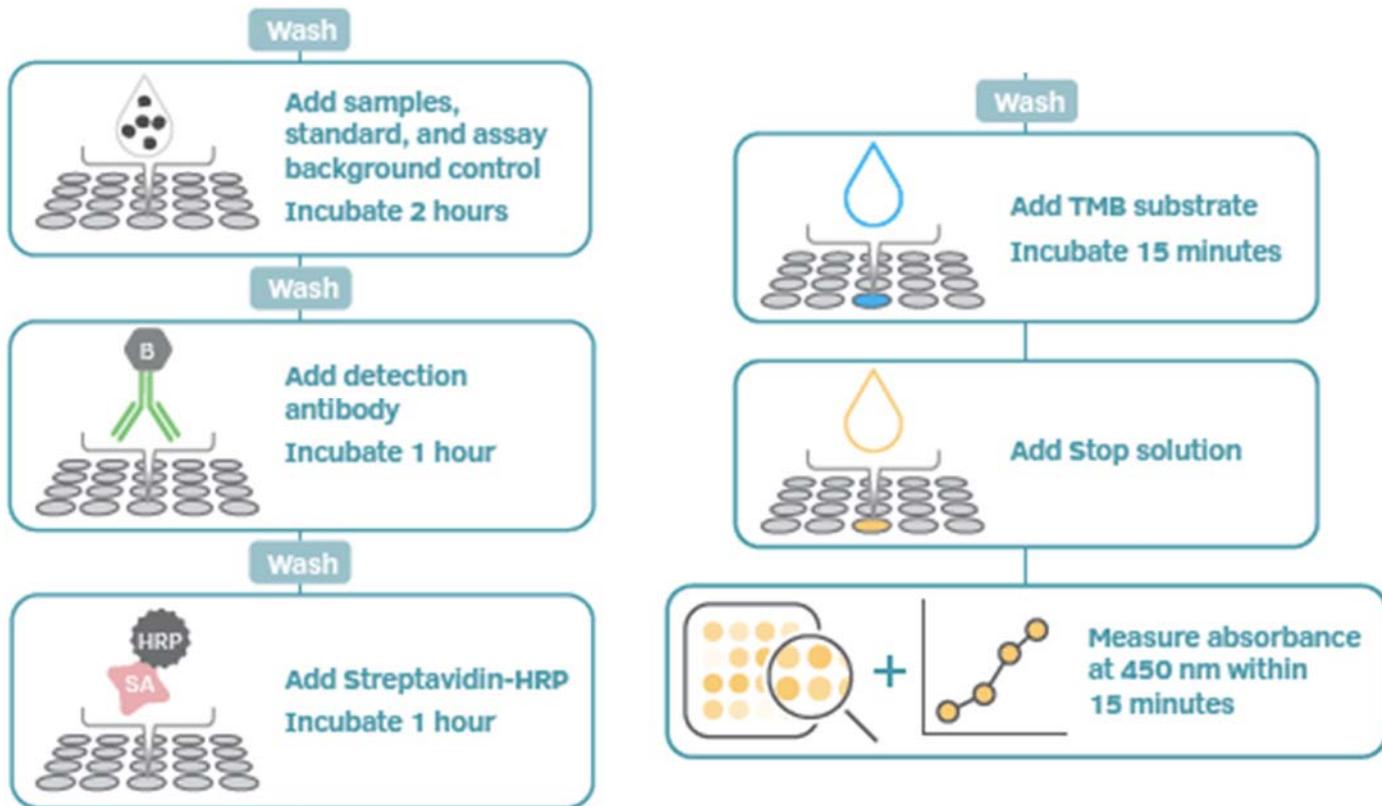
Anexo 2. Esquema de la distribución de muestras en las placas de ELISA

S1	S1	A1	A1	A9	A9	A17	A17	A25	A25	A33	A33
S2	S2	A2	A2	A10	A10	A18	A18	A26	A26	A34	A34
S3	S3	A3	A3	A11	A11	A19	A19	A27	A27	A35	A35
S4	S4	A4	A4	A12	A12	A20	A20	A28	A28	A36	A36
S5	S5	A5	A5	A13	A13	A21	A21	A29	A29	A37	A37
S6	S6	A6	A6	A14	A14	A22	A22	A30	A30	A38	A38
S7	S7	A7	A7	A15	A15	A23	A23	A31	A31	A39	A39
S8	S8	A8	A8	A16	A16	A24	A24	A32	A32	A40	A40

A41	A41										
A42	A42										
A43	A43										
A44	A44										
A45	A45										
A46	A46										
A47	A47										

Se representa la distribución de las muestras por duplicado de la solución estándar (S) y de cada sujeto (A) en las placas de ELISA utilizadas. En amarillo, la solución estándar; en verde, las muestras pertenecientes a los individuos sanos; en rojo, las muestras de los pacientes migrañosos. Se distribuyen según el orden de extracción, para conseguir aleatorizar la posición y evitar, si hubiese errores en la técnica de pipete, que solo afecten a un grupo.

Anexo 3. Esquema del protocolo de ELISA



Los pasos a seguir son: 1) Lavar la placa 5 veces con la solución tampón de lavado, utilizando 300µl/pocillo. Después del último lavado, invertir la placa firmemente sobre papel absorbente y proceder inmediatamente al siguiente paso. 2) Añadir las muestras (diluidas previamente), la solución estándar y el control, pipeteando 100µl/pocillo. Mezclar ligeramente agitando la placa y cubrir con adhesivo. Incubar a temperatura ambiente durante dos horas. 3) Lavar la placa de nuevo como se describe anteriormente. 4) Añadir el anticuerpo, pipeteando 100µl/pocillo. Cubrir la placa con adhesivo. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. 5) Lavar la placa de nuevo como se describe anteriormente. 6) Añadir HRP-estreptavidina, pipeteando 100µl/pocillo. Cubrir la placa con adhesivo. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. 7) Lavar la placa de nuevo como se describe anteriormente. 8) Añadir TMB-sustrato, pipeteando 100µl/pocillo. Incubar a temperatura ambiente y protegido de la luz directa durante 15 minutos. 9) Añadir la solución stop, con 100µl/pocillo. 10) Medir la absorbancia a 450 nm en los próximos 15 minutos. Si es posible, utilizar un lector capaz de abstraer la longitud de onda entre 570 y 650 nm. Disponible en: <https://www.mabtech.com/sites/default/files/datasheets/3714-1HP-1-2-10.pdf>

9. AGRADECIMIENTOS.

A Lola Ganfornina, investigadora en el Instituto de Biología y Genética Molecular y profesora de la Universidad de Valladolid, por enseñarme con pasión todo el protocolo de laboratorio que llevamos a cabo.

A Diego Sánchez, investigador en el Instituto de Biología y Genética Molecular, profesor de la Universidad de Valladolid y tutor de este trabajo, por ser desde el primer momento una fuente de inspiración durante mi trayectoria universitaria.

A Ángel L. Guerrero, neurólogo de la Unidad de Cefaleas del HCUV, profesor de la Universidad de Valladolid y tutor de este trabajo, por poner un paso más cerca la investigación a los estudiantes.

A Andrea Recio, enfermera de la Unidad de Cefaleas del HCUV, por la ayuda en la recogida de muestras.

A Sandra Martín, técnico de laboratorio del Edificio Rondilla del HCUV, por la ayuda en el procesamiento de las muestras.



EVALUACIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA D COMO BIOMARCADOR DE CEFALEAS



Universidad de Valladolid

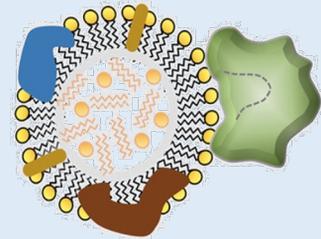
Facultad de Medicina

Trabajo de Fin de Grado de Medicina. Curso 2021-2022

Autor: Lara Arnelas Gil. Tutores: Diego Sánchez Romero, Ángel L. Guerrero Peral

INTRODUCCIÓN

- La migraña es el primer motivo de consulta ambulatoria en neurología.
- El stress oxidativo puede estar implicado en la fisiopatología de la migraña.
- La Apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína de la familia de las lipocalinas relacionada con patologías del sistema nervioso, stress oxidativo y función endotelial, viéndose aumentada su producción en estos procesos.



HIPÓTESIS: La ApoD podría ser un biomarcador de migraña

OBJETIVOS

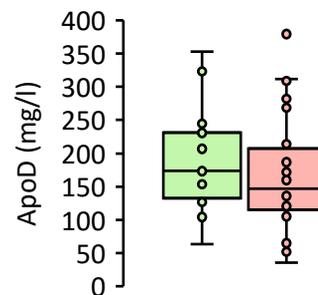
- Cuantificar niveles de expresión de Apolipoproteína D en suero en mujeres con migraña y en mujeres controles.
- Establecer la relación de esos niveles con diferentes situaciones clínicas de migraña.

RESULTADOS

Se recluta a un total de 47 sujetos (n=47), que mediante una entrevista clínica son clasificados: 30 individuos padecían migraña y formarían el grupo de casos (n=30) y 17 sujetos eran controles (n=17).

MATERIAL Y MÉTODOS

- Selección de pacientes migrañosos siguiendo los criterios vigentes de la sociedad internacional de cefaleas (IHS).
- Variables de partida de interés: 1)Edad. 2)Antecedentes personales y familiares de hipercolesterolemia. 3)Años con diagnóstico de migraña. 4)Sintomatología migrañosa (días/mes).
- Determinación en el laboratorio de los niveles de Apolipoproteína D de cada individuo mediante enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).



Distribución de la concentración de ApoD en controles (verde) y casos (rojo)

CONCLUSIONES

- 1 La ApoD sérica no se comporta como biomarcador de migrañas.
- 2 Los individuos con niveles altos de colesterol presentan niveles altos de ApoD, estableciéndose una correlación positiva entre ambas variables de estudio.
- 3 No se pudo establecer relaciones significativas con el resto de variables estudiadas (edad, días al mes de migraña y años de evolución de migraña).

BIBLIOGRAFÍA

- Guerrero AL, Rojo E, Herrero S, Neri MJ, Bautista L, Peñas ML, et al. Characteristics of the first 1000 headaches in an outpatient headache clinic registry. Headache. 2011; 51:226-231.
- Sanchez D, Ganfornina MD. The lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. Front. Physiol.

