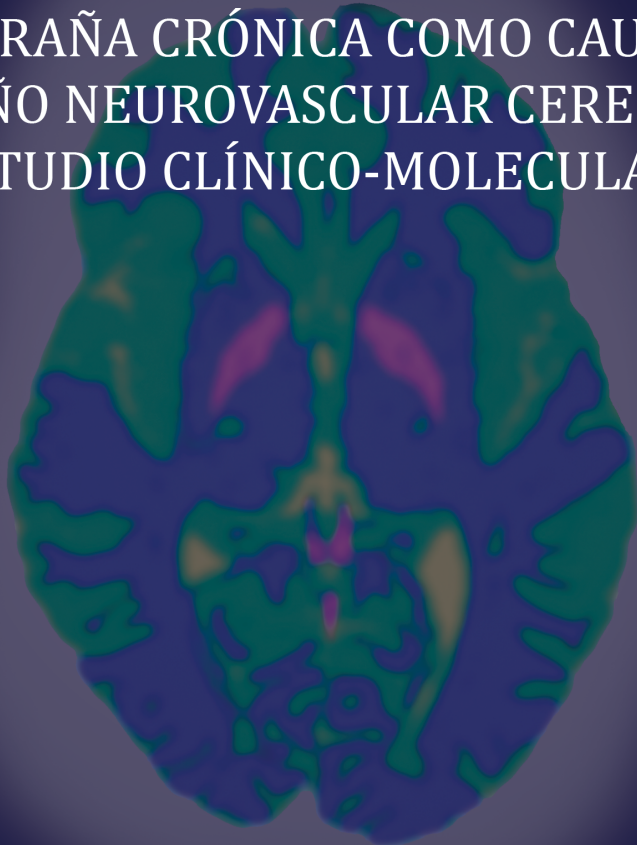




Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Medicina

MIGRAÑA CRÓNICA COMO CAUSA  
DE DAÑO NEUROVASCULAR CEREBRAL:  
ESTUDIO CLÍNICO-MOLECULAR



Tesis Doctoral  
Ana López Ferreiro  
2015





**TESIS DOCTORAL**

**MIGRAÑA CRÓNICA COMO CAUSA DE  
DAÑO NEUROVASCULAR CEREBRAL:  
ESTUDIO CLÍNICO-MOLECULAR**

Ana López Ferreiro

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

**SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**2015**





El **PROF. DR. JOSÉ CASTILLO SÁNCHEZ**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, Coordinador del Laboratorio de Investigación de Neurociencias Clínicas y Director del Área de Neurociencias del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y el **DR. ROGELIO LEIRA MUIÑO**, Médico Adjunto del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICAN:

Que ANA LÓPEZ FERREIRO, ha realizado bajo su dirección el trabajo "Migraña crónica como causa de daño neurovascular cerebral: estudio clínico-molecular" y se encuentra en condiciones para su presentación y defensa como tesis doctoral ante el tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela, para optar al grado de doctor.

Santiago de Compostela, Agosto de 2015

Prof. Dr. José Castillo Sánchez

Dr. Rogelio Leira Muiño



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de muchas personas, a las que quiero mostrar mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, a mis tutores de tesis. Al Prof. José Castillo, por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral, por su valiosa dirección, por sus sugerencias y correcciones y su apoyo. Al Dr. Rogelio Leira, por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este proyecto, por sus brillantes ideas y consejos, por la paciencia y tiempo que ha empleado y por su ánimo y constante empeño, que han hecho que este trabajo fuera posible.

En segundo lugar, a todos los miembros del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, por su apoyo, por ser un ejemplo a seguir y por su generosidad a la hora de enseñar. En especial, al doctor Alfonso Castro por su ayuda al empezar este proyecto. A mis compañeros de la Unidad de Ictus, los doctores Miguel Blanco, Manuel Rodríguez Yáñez, Susana Arias y María Santamaría y a Isabel Jiménez, gracias por lo que he aprendido, por vuestros consejos y vuestra amistad. A la doctora Xiana Rodríguez Osorio, por el tiempo dedicado a lo largo de todos estos años, por transmitirme su ilusión por la neurología y por su amistad. Gracias también a los doctores Francisco Martínez, José María Prieto, Javier López, Enrique Corredera y Angel Sesar por su apoyo y por animarme a acabar lo que había empezado.

A mis compañeros de residencia y a los residentes, a los que también debo llamar amigos, por su constante ánimo y por todos los buenos momentos compartidos.

A todo el equipo de enfermería, tanto de la planta como de consultas externas y del Hospital de día, y a los auxiliares y celadores, por su ayuda.

A todos los miembros del Laboratorio de Investigación en Neurociencias, por iniciarme en el campo de la investigación y por su colaboración en este proyecto, en especial a Tomás Sobrino, por sus aportaciones y su dedicación en el análisis de los marcadores moleculares, y a María Pérez y Alba Vieites.

A Pedro Ramos Cabrer, por el esfuerzo y la dedicación que ha invertido en la parte de neuroimagen, y a la doctora Carmen Villalba, por su tiempo y su trabajo. A ambos, muchas gracias. Extiendo mi agradecimiento a la supervisora del Servicio de Radiología y a los técnicos de la resonancia magnética.

A todos los pacientes y sus familiares, por su colaboración, ya que ellos son el pilar de nuestra labor día a día.

Por último, quiero dedicar este trabajo a mi familia, a mis padres y a mi hermano Manuel, por su apoyo incondicional, por su ayuda, por su paciencia y su cariño. A ellos les debo la vocación por la medicina y todo lo que he conseguido.

A todos vosotros, muchas gracias.

## ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS

**ADMA:** dimetilarginina asimétrica, del inglés *Asymmetric Dymethyl-Arginine*

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AINES:** antiinflamatorios no esteroideos

**ARN:** ácido ribonucleico

**BHE:** barrera hematoencefálica

**BOLD:** contraste endógeno de resonancia magnética dependiente del nivel de oxigenación sanguínea, del inglés, *Blood-Oxygen-Level Dependence*

**cFn:** fibronectina celular

**CFUs:** unidades formadoras de colonias, del inglés *Colony-Forming Unit*

**CGRP:** péptido relacionado con el gen de la calcitonina, del inglés, *Calcitonin Gen Regulator Peptide*

**CIE:** Clasificación Internacional de las Enfermedades

**CLR:** receptor de la calcitonina, del inglés, *Calcitonin Receptor-Like Receptor*

**DCP:** depresión cortical propagada

**DM:** diabetes mellitus

**EDNRB:** receptor tipo B de la endotelina, del inglés *Endothelin Receptor Type B*

**ELISA:** análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**EMPs:** micropartículas endoteliales, del inglés *Endothelial Microparticles*

**ENE:** enolasa neuronal específica

**EPCs:** células progenitoras endoteliales, del inglés *Endothelial Progenitor Cells*

**ET:** endotelina

**EVA:** escala visual analógica

**GMP cíclico:** guanosina monofosfato cíclico

**GPCR:** *G-protein-coupled receptor*

**HSB:** hiperseñales de sustancia blanca

**HTA:** hipertensión arterial

**ICHD:** del inglés *International Classification of Headache Disorders*

**IFN:** interferón

**IHS:** del inglés *International Headache Society*

**IL:** interleucina

**IMC:** índice de masa corporal

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**LIS:** lesiones isquémicas silentes

**MMP:** metaloproteasa de matriz extracelular, del inglés *Matrix Metalloproteinase*

**NKA:** neurokinina A

**NK-1:** receptor 1 de la neurokinina

**NO:** óxido nítrico, del inglés *Nitric Oxide*

**NOs:** enzima sintasa del óxido nítrico, del inglés *Nitric Oxide Synthasa*

**NTC:** núcleo caudal del trigémino

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAG:** sustancia gris periacueductal, del inglés *periaqueductal gray*

**PCR:** proteína C reactiva

**PET:** tomografía por emisión de positrones, del inglés *Positron Emission Tomography*

**Pro-BNP:** pro-péptido natriurético cerebral, del inglés *pro-brain natriuretic peptide*

**PTX3:** pentraxina 3

**PV:** periventricular

**RAMP1:** del inglés *receptor activity modifying protein 1*

**ROI:** región de interés, del inglés *region of interest*

**SBS:** subcortical

**TACR1:** receptor para la taquinina, del inglés *Taquinin Receptor*

**TNF-alfa:** factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor Necrosis Factor alfa*

**TWEAK:** del inglés *tumor necrosis factor-like weak inducer factor*

**VBM:** morfometría basada en vóxel, del inglés *Voxel-Based Morphometry*

**VDE:** vasodilatación dependiente de endotelio

**VIP:** péptido intestinal vasoactivo, del inglés *Vasoactive Intestinal Peptide*

**5HT:** 5-hidroxi-triptamina o serotonina



## ÍNDICE

### ABREVIATURAS

### ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1.1. MIGRAÑA.....	19
1.1.1. CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA.....	19
1.2. MIGRAÑA CRÓNICA.....	21
1.2.1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN.....	21
1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA E IMPACTO SOCIOECONÓMICO DE LA MIGRAÑA CRÓNICA.....	24
1.2.3. FACTORES DE CRONIFICACIÓN.....	26
1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA.....	32
1.3.1. INTRODUCCIÓN.....	32
1.3.1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LOS PRÓDROMOS.....	33
1.3.1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL AURA.....	33
1.3.1.3. FISIOPATOLOGÍA DEL DOLOR.....	37
1.3.2. EL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN EN LA MIGRAÑA.....	41
1.3.2.1. BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA.....	42
1.3.2.2. BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA.....	49
1.3.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y MIGRAÑA.....	52
1.3.3.1. ENDOTELIO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	52
1.3.3.2. BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	54
1.3.3.3. BIOMARCADORES DE REPARACIÓN ENDOTELIAL.....	59
1.3.3.4. MARCADORES NEUROSONOLÓGICOS DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	60

1.3.4. DISRUPCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y DAÑO NEURONAL EN LA MIGRAÑA.....	65
1.3.4.1. BIOMARCADORES DE DISRUPCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.....	65
1.3.4.2. BIOMARCADORES DE DAÑO CEREBRAL.....	67
1.4. NEUROIMAGEN Y MIGRAÑA.....	68
1.4.1. HIPERSEÑALES DE SUSTANCIA BLANCA.....	69
1.4.2. LESIONES ISQUÉMICAS SILENTES.....	71
1.4.3. HIPOINTENSIDADES EN GANGLIOS BASALES Y TRONCO CEREBRAL: DEPÓSITOS DE HIERRO.....	73
1.4.4. CAMBIOS VOLUMÉTRICOS EN LA SUSTANCIA GRIS.....	76
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>81</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>85</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>89</b>
<b>5. PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>93</b>
5.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	93
5.2. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS EVALUADOS.....	95
5.2.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS.....	95
5.2.2. VARIABLES CLÍNICAS.....	95
5.2.3. VARIABLES ULTRASONOGRÁFICAS.....	97
5.2.4. VARIABLES MOLECULARES.....	98
5.2.5. VARIABLES DE NEUROIMAGEN.....	100
5.2.5.1. HIPERSEÑALES DE SUSTANCIA BLANCA.....	101
5.2.5.2. HIPOINTENSIDADES EN GANGLIOS BASALES Y TRONCO CEREBRAL: DEPÓSITOS DE HIERRO.....	101
5.2.5.3. LESIONES ISQUÉMICAS SILENTES.....	113
5.2.5.4. OTROS ANÁLISIS DE NEUROIMAGEN.....	113
5.3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.....	113
5.4. MÉTODO ESTADÍSTICO.....	114

<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>119</b>
6.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO.....	119
6.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLOGICAS.....	119
6.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	119
6.2. ESTUDIO ANALÍTICO.....	121
6.2.1. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES MOLECULARES Y VASODILACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO.....	121
6.2.2. ANÁLISIS DEL ESTUDIO DE NEUROIMAGEN.....	125
6.2.2.1. HIPERSEÑALES DE SUSTANCIA BLANCA.....	125
6.2.2.2. HIPOINTENSIDADES EN RM: DEPÓSITOS DE HIERRO.....	127
6.2.2.3. LESIONES ISQUÉMICAS SILENTES.....	130
6.2.2.4. OTROS ANÁLISIS.....	130
6.3. RELACIÓN ENTRE VARIABLES.....	131
6.3.1. HIPERSEÑALES DE SUSTANCIA BLANCA Y VARIABLES CLÍNICAS.....	131
6.3.2. HIPOINTENSIDADES EN RM Y VARIABLES CLÍNICAS...	133
6.3.3. HIPERSEÑALES DE SUSTANCIA BLANCA, MARCADORES MOLECULARES Y NEUROSONOLÓGICOS.....	134
6.3.4. HIPOINTENSIDADES EN RM, MARCADORES MOLECULARES Y NEUROSONOLÓGICOS.....	135
6.3.5. INFLUENCIA DE LOS MARCADORES MOLECULARES Y NEUROSONOLÓGICOS SOBRE EL VOLUMEN DE LAS HIPOINTENSIDADES EN RM.....	140
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>169</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>



# 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1. MIGRAÑA

### 1.1.1. CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA

La migraña es una cefalea primaria de carácter crónico caracterizada por episodios recurrentes de dolor de horas de duración, habitualmente unilateral y pulsátil, intensa e incapacitante, acompañada de síntomas vegetativos como náuseas o vómitos, hipersensibilidad a la luz y al ruido, y que se puede preceder de síntomas de origen cortical (aura).

Los criterios de la Clasificación Internacional de las Cefaleas – *International Classification of Headache Disorders (ICHD)*- editado por la *International Headache Society (IHS)* permiten establecer el diagnóstico de las distintas cefaleas y variedades de migraña. En 1988 la IHS editó su primera guía diagnóstica de cefaleas<sup>1</sup> y en 2005 publicó una segunda edición.<sup>2</sup> Posteriormente se publicaron dos apéndices monográficos sobre cefalea asociada al abuso de analgésicos<sup>3</sup> y migraña crónica<sup>4</sup>, y finalmente en marzo de 2013 se editó la tercera edición en versión beta, es decir, provisional.<sup>5</sup>

En dicha clasificación se distinguen dos entidades: migraña sin aura y migraña con aura (tabla 1 y 2). La migraña sin aura es la forma de migraña más frecuente (75%), aunque lo más habitual es que en un mismo paciente se sucedan crisis de migraña sin aura y con aura.

La migraña es una de las enfermedades más prevalentes en el mundo, representando el motivo de consulta más frecuente en Neurología y uno de los motivos de consulta más habituales en

Atención Primaria.<sup>6</sup> Más del 11% de la población general padece este problema, con una mayor incidencia en las mujeres (18%) que en los hombres (6%), sobre todo en los años más productivos de la vida (25% en mujeres).<sup>7</sup> Más del 80% de los pacientes con migraña sufre algún grado de discapacidad relacionada con esta cefalea, lo que ha motivado que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incluya entre los trastornos más incapacitantes.<sup>8</sup> En los últimos años se ha estudiado de forma muy activa la repercusión de la migraña sobre la calidad de vida de los pacientes que la sufren, así como la repercusión laboral y económica que genera dada la alta prevalencia durante la edad media de la vida (20-50 años).

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA MIGRAÑA SIN AURA
A. Al menos 5 ataques de migraña que cumplen los criterios B, C y D
B. Episodios de cefalea de entre 4 y 72 horas de duración (no tratados o tratados sin éxito)
C. La cefalea presenta, al menos, dos de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"><li>• Localización unilateral</li><li>• Carácter pulsátil</li><li>• Dolor de intensidad moderada o severa</li><li>• Empeora o condiciona el abandono de la actividad física habitual (p. ej., andar o subir escaleras)</li></ul>
D. Al menos uno de los siguientes durante la cefalea: <ul style="list-style-type: none"><li>• Náuseas y/o vómitos</li><li>• Fotofobia y fonofobia</li></ul>
E. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la ICHD-III

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de la migraña sin aura (ICHD III-versión beta, 2013).

<b>CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA MIGRAÑA CON AURA</b>
A. Al menos dos crisis que cumplan los criterios B, C y D
B. Uno o más de los síntomas de aura siguientes totalmente reversibles: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Visuales</li> <li>• Sensitivos</li> <li>• Lenguaje</li> <li>• Motores</li> <li>• Troncoencefálicos</li> <li>• Retinianos</li> </ul>
C. Al menos dos de las siguientes cuatro características: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Progresión gradual de al menos uno de los síntomas de aura durante un período mayor o igual a 5 minutos y/o dos o más síntomas se presentan consecutivos.</li> <li>• Cada síntoma de aura tiene una duración entre 5 y 60 minutos.</li> <li>• Al menos un síntoma del aura es unilateral.</li> <li>• El aura se acompaña, o se sigue antes de 60 minutos, de cefalea.</li> </ul>
D. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la ICHD-III y se ha descartado un accidente isquémico transitorio.

**Tabla 2.** Criterios diagnósticos de la migraña con aura (ICHD III-versión beta, 2013).

## 1. 2. MIGRAÑA CRÓNICA

### 1.2.1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

El término de migraña crónica se incluyó por primera vez en el año 2004 en la segunda edición de la clasificación de las cefaleas de la IHS<sup>2</sup> como una complicación de la migraña, siendo revisado en el año 2006. Previamente, en 1987, Mathew había acuñado el término de “migraña transformada” como una migraña episódica que progresa en gravedad

y frecuencia.<sup>10</sup> En 1994 Silberstein y Lipton<sup>11</sup> propusieron los criterios clínicos que la definieron durante años, permitiendo el diagnóstico de migraña transformada con o sin abuso de analgesia.

La última versión de la clasificación de la IHS publicada en 2013, la ICHD-III versión beta<sup>5</sup>, reconoce a la migraña crónica como una entidad en sí misma. Esta versión es provisional, ya que actualmente la IHS está reuniendo las aportaciones de los expertos para mejorarla y editar una versión definitiva simultánea a la 11<sup>a</sup> edición de la Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE-11) de la OMS prevista para el 2015-2016. El cambio más significativo de la última versión es que ahora considera a la migraña crónica como una tercera forma de migraña, cuando antes la consideraba una complicación. Además han cambiado los criterios diagnósticos: en la anterior clasificación se especificaba que solo los pacientes con migraña sin aura podían presentar migraña crónica, mientras que en la ICHD-III beta es indiferente que el paciente presente aura o no. Asimismo los pacientes con migraña crónica pueden ser incluidos aunque abusen de analgésicos, mientras que en la ICHD-II este hecho era un criterio de exclusión (tabla 3 y 4). Actualmente en los pacientes que cumplan criterios de migraña crónica y de cefalea por abuso de analgesia deberán considerarse ambos diagnósticos.

CRITERIOS MIGRAÑA CRÓNICA (ICHD 2006)
A. Cefalea (tipo tensión o migraña), más de 15 días al mes durante al menos 3 meses
B. Al menos 5 crisis que cumplen los criterios de migraña sin aura
C. Durante al menos 8 días al mes y al menos durante 3 meses, la cefalea ha cumplido los criterios C1 o C2 (dolor o síntomas asociados de migraña sin aura): C1. Al menos dos de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Localización unilateral</li> <li>b. Calidad pulsátil</li> <li>c. Intensidad moderada o grave</li> <li>d. El dolor se agrava con la actividad física rutinaria o condiciona evitarla, junto con al menos dos de los siguientes:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Náuseas y/o vómitos</li> <li>- Fotofobia y sonofobia</li> </ul> </li> </ul> C2. Alivio de la cefalea con triptanes o ergóticos antes del esperado desarrollo de los criterios C1.
D. Sin abuso de analgésicos y no atribuible a otra causa

**Tabla 3.** Criterios de migraña crónica (ICHD-IIR, 2006).

Hoy en día se define la migraña crónica por la presencia de cefalea durante 15 o más días al mes durante al menos 3 meses, de los que al menos 8 deben cumplir criterios de migraña con y sin aura o responder a triptanes o ergóticos en ausencia de abuso de analgesia y no atribuibles a otra causa (tabla 4).

CRITERIOS DE LA MIGRAÑA CRÓNICA (ICHD 2013)
A. Cefalea de tipo tensional o migrañoso durante un período de 15 o más días al mes durante más de 3 meses que cumple los criterios B y C
B. Aparece en un paciente que ha sufrido al menos 5 crisis que cumplen los criterios B-D para la migraña sin aura y los criterios B y C para la migraña con aura
C. Durante un período de 8 o más días al mes por espacio de más de 3 meses cumple al menos uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"><li>• Criterios C y D para la migraña sin aura</li><li>• Criterios B y C para la migraña con aura</li><li>• En el momento en el que aparece el paciente cree que es migraña y se alivia con un triptán o derivado ergotico</li></ul>
D. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la IHCD-III

Tabla 4. Criterios de la migraña crónica (ICHD-III beta, 2013).

### 1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA E IMPACTO SOCIOECONÓMICO DE LA MIGRAÑA CRÓNICA

La prevalencia de la migraña crónica varía según los diferentes estudios y criterios diagnósticos utilizados.<sup>12</sup> En nuestro medio se ha estimado una prevalencia en torno al 2% de la población<sup>13</sup>, aunque los valores dependen de los criterios de clasificación empleados, considerando un rango de 0,9-5,1%.<sup>14-25</sup>

El pico de máxima prevalencia de la migraña episódica se alcanza entre los 30-40 años de edad, mientras que en la migraña crónica se retrasa una década. La migraña crónica constituye uno de los motivos

de consulta más frecuente en neurología general y afecta al 5-10% de los pacientes vistos en consultas.<sup>26</sup>

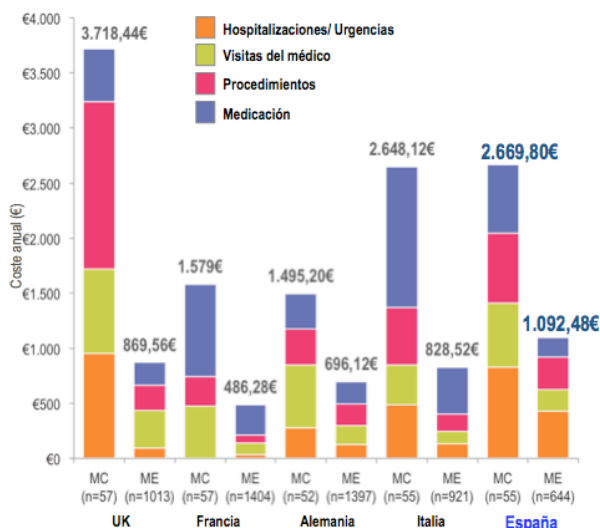
Los estudios sobre la incidencia de la migraña crónica son escasos. En el *American Migraine Prevalence and Preventive Study* (AMPP), un 2,5% de pacientes con migraña episódica al inicio desarrolló una forma crónica con o sin abuso de medicación tras 1 año de seguimiento.<sup>27,28</sup>

La OMS considera la migraña crónica como una enfermedad de las más incapacitantes. El estudio internacional más importante realizado para medir la discapacidad e impacto en la calidad de vida de los pacientes con migraña es el *International Burden of Migraine Study* (IBMS).<sup>30-31</sup> Se trata de un estudio multicéntrico realizado en Australia, Canadá, Francia, Alemania, Italia, España, Reino Unido, Taiwán y Estados Unidos en el que se se encontró que los pacientes con migraña tenían una mayor discapacidad y mayores niveles de ansiedad y depresión.

La migraña crónica se asocia con mayor discapacidad y deterioro de la calidad de vida que la migraña episódica<sup>31</sup> y ocasiona una disminución de la productividad personal y laboral cuatro a seis veces mayor que la ME.<sup>12,30</sup>

Se han realizado diversos estudios socioeconómicos que han intentado estimar el coste sanitario de la migraña crónica.<sup>31,32,33</sup> El IBMS comparó el coste de la migraña crónica y de la migraña episódica en cinco países europeos (Inglaterra, Francia, Alemania, Italia y España). En este estudio encontraron que los pacientes con migraña crónica utilizaban más recursos sanitarios, debido a un mayor número de visitas al hospital, un mayor empleo de fármacos para la migraña y un mayor uso de exploraciones complementarias, que los pacientes

con migraña episódica (figura 1). El coste sanitario medio de los pacientes con migraña crónica era tres veces superior al de los que padecían migraña episódica.



**Figura 1.** Coste sociosanitario de la migraña crónica (MC) y la migraña episódica (ME) en Inglaterra, Francia, Alemania, Italia y España (adaptado de 31).

### 1. 2.3. FACTORES DE CRONIFICACIÓN

Los estudios epidemiológicos han demostrado que cada año un 2,5% de los pacientes con migraña episódica se transforma en migraña crónica.<sup>29</sup> El paso de migraña episódica a crónica se produce de forma gradual, es decir, los pacientes pasan de tener una migraña episódica de baja frecuencia a una de alta frecuencia y, finalmente, a una migraña crónica.<sup>34</sup> Los factores de riesgo de cronificación se pueden dividir en dos tipos: modificables y no modificables (tabla 5).

<b>Factores de riesgo no modificables</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad</li> <li>• Sexo femenino</li> <li>• Raza caucásica</li> <li>• Estatus socioeconómico bajo</li> <li>• Factores genéticos</li> </ul>
<b>Factores de riesgo modificables</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frecuencia de los ataques</li> <li>• Obesidad</li> <li>• Abuso de analgesia</li> <li>• Trastornos psiquiátricos</li> <li>• Apnea del sueño</li> <li>• Ingesta excesiva de cafeína</li> <li>• Presencia de otros trastornos de dolor crónico</li> </ul>

**Tabla 5.** Factores de riesgo de cronificación de la migraña episódica (adaptado de 35).

Estos factores de riesgo aportan información sobre la fisiopatología de la migraña crónica y sobre las intervenciones necesarias para intentar modificar el curso evolutivo de la enfermedad.<sup>35,36</sup>

### 1.2.3.1. Factores de riesgo no modificables

Dentro de los factores de riesgo no modificables se incluyen la edad, ser mujer, raza caucásica y bajo nivel socioeconómico/cultural.

### 1.2.3.2. Factores de riesgo modificables

#### **Progresión de las crisis**

Los estudios poblacionales señalan que un mayor número de crisis de migraña al mes supone una mayor probabilidad de desarrollar migraña crónica. El riesgo se incrementa de forma no lineal. Así se

puede considerar que los pacientes con dolor durante más de 10 días al mes (punto de inflexión o de “no retorno”), presentan una sobrecarga del sistema que genera un fallo en la red neuronal de tal magnitud que resulta imposible restaurar el equilibrio entre los mecanismos pronociceptivos y antinociceptivos. Un marcador de esta situación es la alodinia cutánea.<sup>37</sup>

### **Obesidad**

La prevalencia de la migraña no es superior en pacientes con obesidad. Sin embargo el riesgo relativo de padecer una cefalea crónica diaria es cinco veces superior si el índice de masa corporal (IMC) es mayor de 30 (obesidad mórbida). Este riesgo es tres veces mayor si el IMC está entre 25 y 29.<sup>38</sup> Dentro de los tipos de cefalea crónica se ha observado una mayor predisposición de los pacientes obesos a padecer cefalea de tipo migrañoso que cefalea tensional. Existen diversas hipótesis para explicar este hallazgo. Una de ellas es que los adipocitos producen y liberan al torrente sanguíneo mediadores de inflamación como son la proteína C-reactiva (PCR), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y las interleucinas, péptidos inflamatorios que desempeñan un papel conocido en la fisiopatología de la migraña.

### **Abuso de analgésicos**

Diversos estudios poblacionales señalan que muchos pacientes con migraña crónica no cumplen criterios de abuso de analgesia<sup>39,40</sup> (tabla 6). Posiblemente parte de la percepción generalizada que asocia migraña crónica y abuso de analgésicos se deba al sesgo de selección

inherente a los estudios realizados en centros de referencia en cefaleas. Según esto, el abuso de analgesia podría considerarse más como consecuencia, que como causa de migraña crónica. El mayor riesgo de desarrollar migraña crónica se asocia a abuso de barbitúricos (OR 1.7, frecuencia crítica de uso > 5 días/mes) y opioides (OR 1.4, frecuencia crítica de uso 8 días/mes).<sup>28</sup> El abuso de triptanes también se asocia a un mayor riesgo de transformación, aunque el riesgo es menor que con el uso de opioides o barbitúricos.<sup>41</sup> El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) puede reducir el riesgo de transformación en aquellos pacientes que presentan cefalea de 9 a 14 días/mes, pero aumenta el riesgo en pacientes que presentan cefalea de 10 a 15 días/mes.<sup>28</sup>

<b>Ergóticos</b>	> 10 días al mes durante $\geq$ 3 meses
<b>Triptanes</b>	> 10 días al mes durante $\geq$ 3 meses
<b>Analgésicos</b>	> 15 días al mes durante $\geq$ 3 meses
<b>Opiáceos</b>	> 10 días al mes durante $\geq$ 3 meses
<b>Combinaciones</b>	> 10 días al mes durante $\geq$ 3 meses

**Tabla 6.** Criterios temporales de abuso de medicación.

### **Trastornos psiquiátricos**

Existen multitud de estudios que relacionan la migraña y diversas alteraciones psiquiátricas. La asociación entre migraña crónica y depresión parece ser bidireccional, de modo que la depresión parece ser factor de riesgo y, a su vez, consecuencia.<sup>42</sup> Aunque el riesgo de sufrir depresión es mayor en la migraña crónica que en la migraña

episódica, cuando la depresión está presente en la migraña episódica se comporta como un predictor de migraña crónica.

### **Apnea del sueño**

La presencia de apnea del sueño es un factor independiente para la cronificación de cualquier tipo de cefalea.<sup>43,44</sup> Los mecanismos fisiopatológicos serían la fragmentación del sueño, la hipoxia y la hipertensión arterial. Además es importante señalar que existe un solapamiento entre las vías involucradas en la migraña y en el sueño, sobre todo a la altura del tronco del encéfalo y diencefalo. La adenosina, la melatonina y la orexina son péptidos involucrados en ambos sistemas<sup>45</sup>, por lo que sería fácil imaginar cómo la disfunción de uno de ellos acarrearía una mayor probabilidad de generar una disfunción en el otro.

### **Abuso de cafeína**

Los estudios epidemiológicos han demostrado que los pacientes con migraña crónica han consumido altas cantidades de cafeína durante el período en que padecían migraña episódica, a diferencia de pacientes que no se han cronificado.<sup>46</sup>

### **Otros factores**

Existen otros factores que pueden contribuir a la cronificación del dolor, pero en el momento actual no hay suficiente evidencia en favor o en contra. Muchos de ellos son comórbidos con la migraña, y pueden tener una base fisiopatológica común, por lo que justificaría la mayor prevalencia en los pacientes con migraña crónica que en la población

general. Uno de estos factores es la alodinia cutánea, que no es más que la manifestación clínica del mecanismo fisiopatológico de la sensibilización central. Hasta el 75% de pacientes desarrolla alodinia durante una crisis de migraña.<sup>47</sup> Estudios poblacionales han demostrado una mayor prevalencia de alodinia en pacientes con migraña crónica (68%) que con migraña episódica (63%,  $p < 0,01$ ).<sup>48</sup> Los estudios funcionales realizados en sujetos sanos en los que se ha inducido alodina muestran una activación en los núcleos del tronco cerebral implicados en la génesis de la migraña.<sup>49</sup>

Afortunadamente es frecuente que los pacientes con migraña crónica reviertan a una migraña episódica. El estudio AMPP encontró que tras dos años de seguimiento, el 26,1% de los pacientes con migraña crónica revirtieron a migraña episódica, el 40% tuvo una forma transicional y el 34% siguió cumpliendo criterios de migraña crónica.<sup>27</sup> Estos datos son concordantes con los de otros estudios publicados y sugieren que la migraña crónica es un estado dinámico, en el que los pacientes fluyen entre un patrón episódico y crónico. Los factores que se asocian a la reversion de la migraña crónica son: menor frecuencia de las crisis (15-19 vs. 25-31 días/mes), ausencia de alodinia, adherencia al tratamiento profiláctico, abandono del abuso de analgesia y ejercicio físico.<sup>29,50</sup>

### 1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA

#### 1.3.1. INTRODUCCIÓN

La migraña es un trastorno neurológico en el que se ven implicados mecanismos vasculares y neurógenos. Existen dos teorías clásicas acerca de la patogénesis de la migraña: la teoría vasogénica y la teoría neurogénica. Ambas teorías por separado no lograron justificar todos los fenómenos que suceden en las crisis de migraña, por lo que las teorías más recientes tratan de unificar ambas.

La teoría vasogénica fue descrita por primera vez en 1660 por Thomas Willis.<sup>51</sup> En el siglo XX, Wolff proponía que el fenómeno del aura se debía a una vasoconstricción transitoria de las arterias intracraneales y que el dolor aparecía por una vasodilatación de rebote en los vasos cerebrales y meníngeos.<sup>52</sup> Según la localización de la vasoconstricción de los vasos sanguíneos se explicarían los distintos síntomas del aura. La vasodilatación reactiva sería responsable de la aparición del dolor, por estimulación de fibras nerviosas sensitivas perivasculares. Esta teoría clásica de la cefalea secundaria a una vasodilatación simple se ha descartado, ya que no explica los distintos síntomas que acompañan al dolor y los estudios realizados en los últimos años confirman que la vasodilatación no es condición necesaria para que se produzca una crisis de migraña.

En contraposición la teoría neurogénica propone que las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral se desarrollan como consecuencia de fenómenos neuronales. Esta teoría se basa en el concepto de depresión cortical propagada (DCP) propuesto por Leao en 1944<sup>53</sup> (figura 2). Leao observó unas ondas de excitación que se

propagaban a nivel del córtex visual (“depresión propagada”) en animales de experimentación, postulando que constituía la base del aura de la migraña.

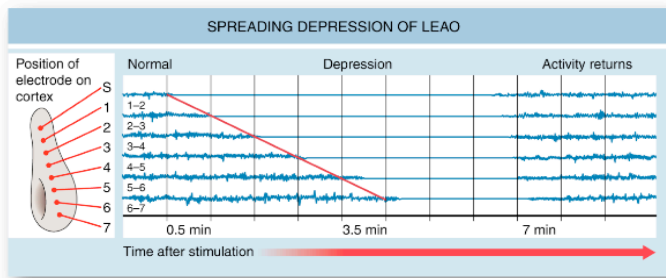


Figura 2. Depresión cortical propagada, Leao 1944 (adaptado de 53).

La fisiopatología de la migraña debe explicar los tres fenómenos que suceden en una crisis de migraña: pródromos, aura y dolor.

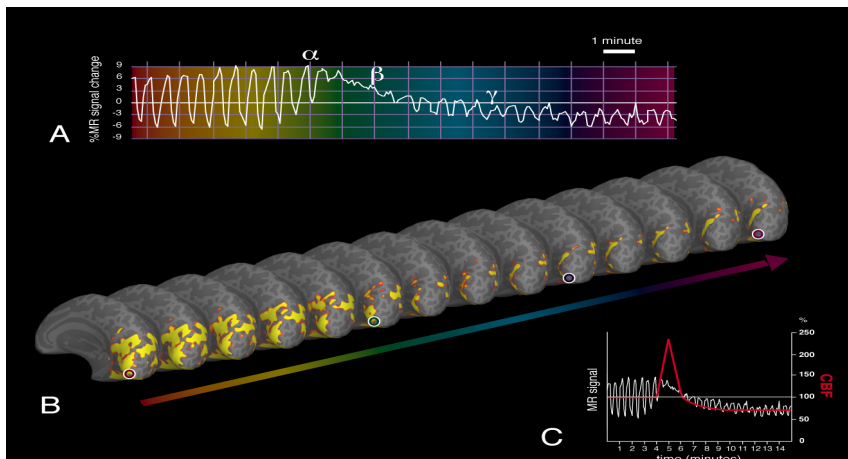
### 1.3.1.1. Fisiopatología de los pródromos

Ocurren en las horas previas a la crisis y a veces durante ella. Estos síntomas serían debidos a una disfunción hipotalámica dada su capacidad de marcar los ritmos biológicos, pero su mecanismo todavía es desconocido.<sup>54-56</sup> Por sus características (bostezos, cambios de humor, retención hídrica, avidez por los dulces) podrían ser de base dopaminérgica.

### 1.3.1.2. Fisiopatología del aura

Hoy en día se acepta que el sustrato fisiopatológico subyacente es un fenómeno de despolarización neuronal y glial similar a la DCP.<sup>57</sup> Estudios mediante tomografía por emisión de positrones (PET) y

resonancia magnética (RM) funcional han demostrado la propagación de ondas de actividad cortical y flujo vascular cerebral durante una crisis de migraña con las mismas características temporales y espaciales que la DCP (figura 3).<sup>58,59</sup>



**Figura 3.** Mecanismos fisiopatológicos del aura de la migraña demostrados mediante RM funcional (adaptado de 59).

Dicha despolarización se acompaña de fenómenos vasculares consistentes en una fase inicial de hiperemia cortical de pocos minutos de duración, seguida de una fase de hipoperfusión de varias horas de duración. Estos cambios migran a una velocidad de 3,5 mm/seg, la misma a la que se calcula que progresa el escotoma durante el aura visual.<sup>60</sup> El mecanismo que subyace en la DCP sería el siguiente: ante un estímulo irritante (mecánico o eléctrico, administración de glutamato o potasio) se provoca una despolarización con la consiguiente entrada de sodio, calcio, agua y cloro al interior de las neuronas y de las células gliales, y salida de hidrógeno y potasio al espacio extracelular. Esta despolarización provoca una liberación de

aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato).<sup>61,62</sup> La posible importancia de la liberación de glutamato en el aura migrañosa es apoyada indirectamente por el hecho de que en tres anomalías genéticas conocidas en la migraña hemipléjica familiar se incrementa la liberación de glutamato.<sup>63</sup> Otra vía fisiopatológica sugiere que existe un déficit de magnesio en los lóbulos occipitales de los pacientes con migraña, lo que daría lugar a una disfunción mitocondrial con disminución de la fosforilación oxidativa y de la producción de energía. La acción de estos aminoácidos excitadores y el propio potasio serían los responsables de la propagación del fenómeno, conjuntamente con los niveles disminuídos de magnesio cerebral<sup>64,65</sup>. Estos metabolitos producidos como consecuencia de la DCP activarán las terminaciones nerviosas trigeminales que rodean los vasos de la duramadre (sistema trigeminovascular).

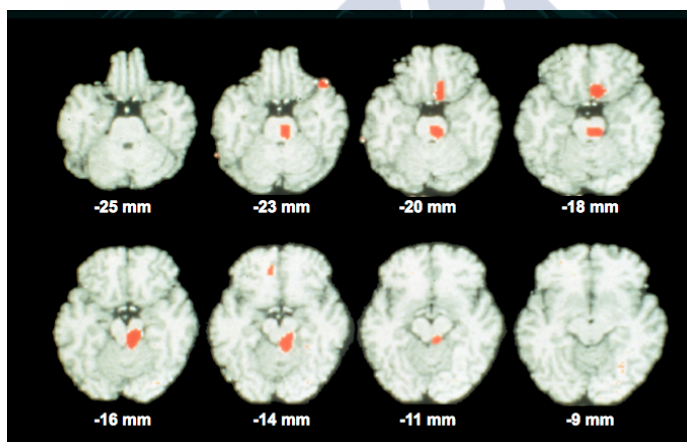
Además durante los fenómenos de DCP se incrementan las concentraciones locales de óxido nítrico (NO) que podría suponer, a su vez, una retroalimentación negativa sobre los procesos que han generado la DCP.<sup>66,67</sup>

Se considera que la migraña sin aura es una expresión incompleta, pero con la misma fisiopatología que la que cursa con aura. Existen estudios mediante PET y RM funcional que demuestran la existencia de una depresión cortical propagada clínicamente silente.<sup>68</sup>

La depresión funcional neuronal explica los fenómenos deficitarios del aura, pero no está claro que sea la base del dolor, ni siquiera a través de los cambios vasomotores que siguen a la onda de despolarización. A pesar de ello es interesante señalar que algunos

fármacos capaces de prevenir la migraña, como el topiramato, previenen experimentalmente la depresión propagada.

Tampoco es la DCP la única disfunción objetivable en las crisis de migraña. Los estudios iniciales de PET de Weiller<sup>69</sup>, y posteriormente del grupo de Goadsby<sup>70-72</sup> han demostrado la participación de estructuras mesencefálicas y pontinas, detectando durante las crisis un incremento metabólico focal en el tronco cerebral lateralizado al lado del dolor, en la región que contiene la sustancia gris periacueductal, los núcleos del rafe y el *locus coeruleus* (figura 4), que son el principal origen de la innervación serotoninérgica y noradrenérgica respectivamente.



**Figura 4.** Áreas de activación mediante PET en el tronco cerebral durante las crisis de migraña (adaptado de 69).

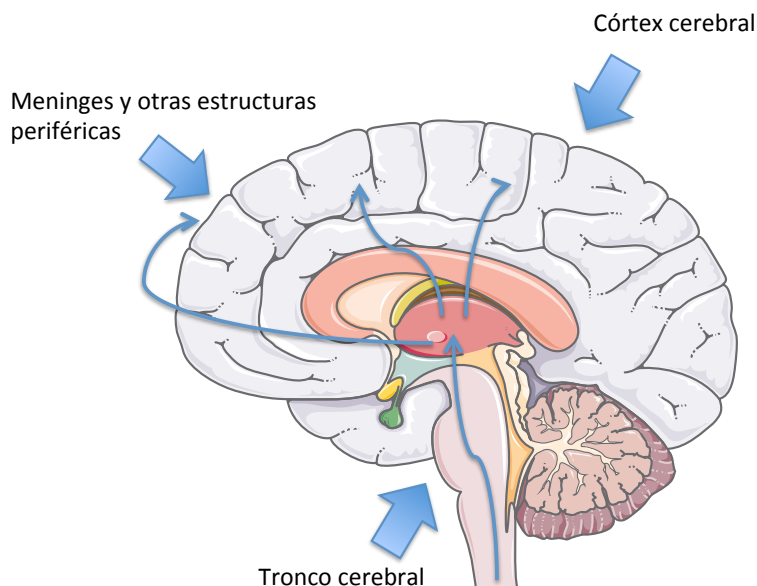
Ambos sistemas se han implicado clásicamente en la génesis de las crisis de migraña. De hecho los antagonistas serotoninérgicos (5HT 2) como el pizotifeno o adrenérgicos como el propranolol son útiles como preventivos de la migraña. Estos estudios motivan el debate en

torno a si dichas estructuras participan en la generación del dolor específico de la migraña o más bien modulan la señal de dolor una vez iniciado. En teoría aquellas áreas relacionadas con el dolor se desactivarían tras administrar tratamiento, mientras que las áreas implicadas en la génesis del dolor permanecerían activas. Un estudio realizado mediante PET demostró que tras la administración de sumatriptán durante una crisis de migraña las estructuras del tronco cerebral permanecían activas.<sup>73</sup>

### 1.3.1.3. Fisiopatología del dolor

Los tres elementos que intervienen en la fisiopatología del dolor son: los núcleos del tronco cerebral (núcleo caudal del trigémino, sustancia gris periacueductal), la corteza cerebral y los vasos meníngeos y su inervación por el trigémino (sistema trigeminovascular), figura 5.

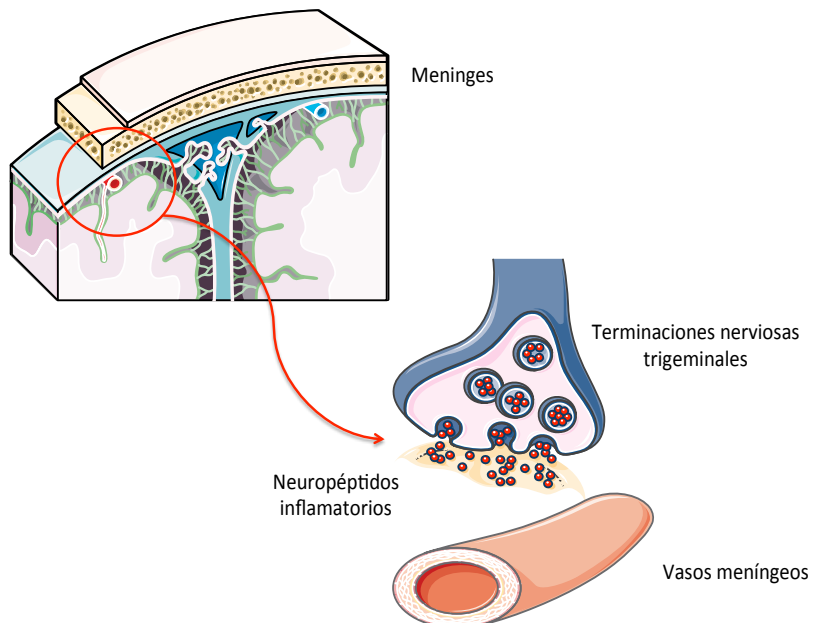
El sistema trigeminovascular está constituido por los vasos meníngeos (duramadre y piales) y las fibras sensitivas procedentes de la primera rama del nervio trigémino (fibras A-delta y fibras C) que rodean a dichos vasos (figura 6). También forman parte de este sistema las primeras raíces cervicales, cuyas aferencias nociceptivas terminan en el núcleo caudal del trigémino. Las terminaciones nerviosas sensitivas perivasculares y los núcleos trigeminales constituyen el brazo aferente del sistema trigeminovascular, mientras que las fibras parasimpáticas del nervio facial constituyen su brazo eferente. Se han demostrado conexiones entre los núcleos del tronco cerebral y las terminaciones nerviosas sensitivas trigeminales.<sup>74</sup>



**Figura 5.** Estructuras implicadas en la fisiopatología del dolor en la migraña.

Una posible explicación de la aparición del dolor podría ser la siguiente: los núcleos del tronco cerebral en personas genéticamente predispuestas reaccionan de manera anormal ante ciertos estímulos (cambios de sueño, estrés, etc.). A su vez esta actividad anormal sensibiliza tanto a la corteza cerebral como a otros núcleos del tronco (vestibulares, reflejo nauseoso, etc.), y en especial al núcleo del trigémino. La hipersensibilidad de la corteza favorecería la DCP que activa a las terminaciones del sistema trigeminovascular que rodean a los vasos de la duramadre, liberando péptidos vasoactivos como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la neurokinina A (NKA), la sustancia P (SP) y la endotelina (ET), que inducen una inflamación meníngea aséptica. Estos péptidos inducen cambios a nivel meníngeo consistentes en vasodilatación arterial, extravasación de

proteínas, agregación plaquetaria, activación de macrófagos locales y liberación de serotonina, que provocan la aparición del dolor. La inflamación estéril de la duramadre provoca la sensibilización de fibras nerviosas sensitivas a determinados estímulos que previamente resultaban inócuos, como las pulsaciones de los vasos sanguíneos o cambios en la presión venosa, y que ahora determinan un aumento de la mecanosensibilidad y una hiperalgesia (mecanismo conocido como sensibilización periférica). Los procesos que sensibilizan a los receptores periféricos y la información nociceptiva se transmite a los núcleos trigeminales y de ahí al tálamo y al córtex cerebral, donde se percibe la sensación dolorosa (figura 7).



**Figura 6.** Esquema de las estructuras del sistema trigeminovascular.

La parte caudal del núcleo trigeminal es la que controla todo éste sistema. Tanto la vasodilatación como la inflamación vascular estéril están controladas por el sistema serotoninérgico, que tiene varios tipos de receptores, sobre los que actúan distintos fármacos.<sup>75,76</sup> El receptor 5HT 1B es postsináptico en la pared del vaso, y su estímulo revierte la vasodilatación leptomeníngea, mientras que el 5HT 1D se encuentra en las terminaciones nerviosas trigeminales, a nivel presináptico, y regula la inflamación estéril. La eficacia de los triptanes va ligada sobre todo al efecto sobre el receptor 5HT 1B.

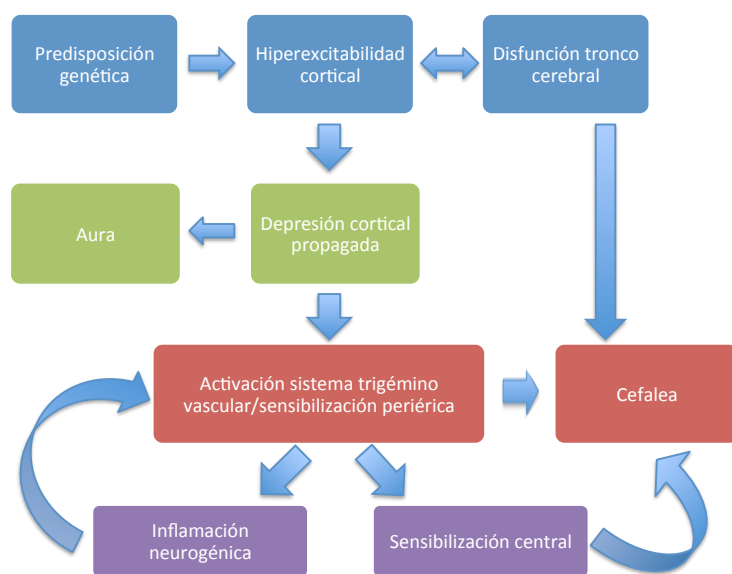


Figura 7. Fisiopatología de la migraña.

Además de lo anteriormente expuesto, se considera que en la migraña y en otras cefaleas primarias existe desde el comienzo o se desarrolla con la repetición de las crisis, una sensibilización central al

estímulo doloroso trigeminal aferente hacia la sustancia gris periacueductal y el tálamo. Clínicamente se manifiesta por alodinia, hiperalgesia e hiperpatía durante los episodios de dolor e incluso fuera de ellos. Asimismo la hipersensibilización central y/o periférica puede ser uno de los factores determinantes para la evolución de migraña episódica a migraña crónica. Estudios de neuroimagen han revelado alteraciones tanto anatómicas como funcionales en pacientes con migraña crónica. La mayoría de estos hallazgos apuntan a una disfunción en el sistema de procesamiento del dolor.

### 1.3.2. EL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN EN LA MIGRAÑA

La inflamación desempeña un papel esencial en la fisiopatología de la migraña.

BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN	
<b>BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CGRP</li> <li>• ET-3</li> <li>• VIP</li> <li>• SP</li> <li>• NKA</li> </ul>
<b>BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citocinas</li> <li>• TNF-alfa</li> <li>• IL-6</li> <li>• IL-10</li> <li>• IL-beta</li> <li>• TGF-beta</li> <li>• Adiponectina</li> <li>• PCR</li> <li>• Lípidos</li> </ul>

Tabla 7. Marcadores moleculares de inflamación en la migraña.

La activación de las terminaciones nerviosas trigeminales durante las crisis favorece la liberación de péptidos inflamatorios, que promueven la inflamación neurogénica. Éstos a su vez actúan sobre la pared del vaso produciendo la vasodilatación de las arterias meníngeas y activación de mastocitos localizados en los espacios perivasculares, que liberan distintos mediadores vasoactivos y proinflamatorios sistémicos (tabla 7).

### **1.3.2.1. Biomarcadores de inflamación neurogénica**

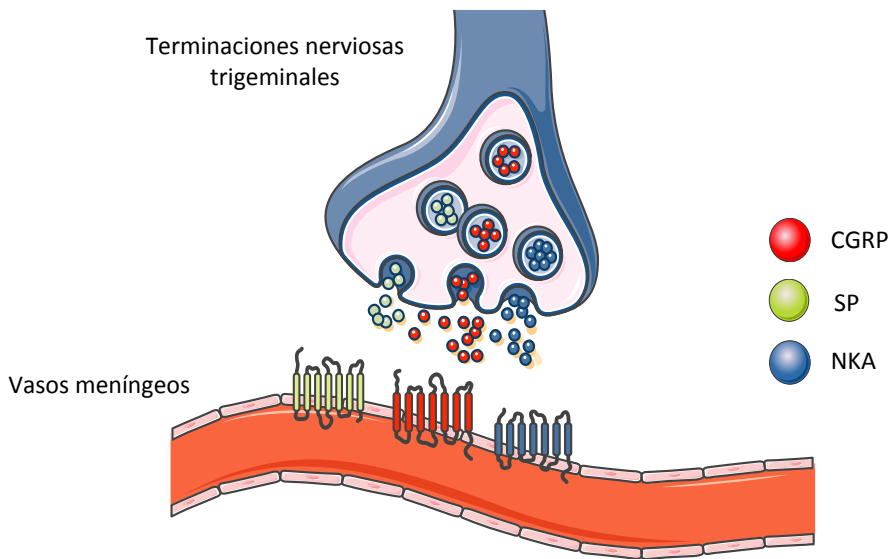
#### **Péptido relacionado con el gen de la calcitonina**

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) es un neuropéptido constituido por 37 aminoácidos que pertenece a la familia de la calcitonina. En el sistema nervioso podemos encontrar altas cantidades de ARN mensajero específico para el CGRP.<sup>77</sup> Existen dos isoformas en humanos (alfa y beta), que se diferencian únicamente en 2 aminoácidos y comparten una actividad biológica y funciones similares.<sup>78</sup>

El CGRP se encuentra en todas aquellas localizaciones implicadas en la fisiopatología de la migraña: meninges, ganglio de Gasser, núcleos trigeminales y otros núcleos del tronco cerebral o en el córtex. Los vasos sanguíneos cerebrales están inervados de forma preferente por fibras nerviosas sensoriales que contienen CGRP<sup>79</sup>, tal y como se ha demostrado mediante estudios de inmunorreactividad.<sup>80</sup>

El CGRP se libera desde las terminaciones nerviosas trigeminales junto a otros péptidos vasoactivos (figura 8) y ejerce su acción a través de un receptor heterotrímico, formado por una proteína de 7 dominios transmembrana (CLR o *calcitonin receptor-like receptor*), que

se suplementa con una proteína G transmembrana (GPCR o *G-protein-coupled receptor*) y una proteína accesoria que modifica su actividad (RAMP1 o *receptor activity modifying protein 1*).<sup>81-82</sup> Su vida media en humanos es de 7 a 10 minutos aproximadamente.<sup>83</sup> La liberación de CGRP está modulada por una serie de sustancias que actúan sobre receptores y canales específicos en la terminal presináptica de las fibras nerviosas sensitivas, como es el caso de los opioides, bradiquinina, 5-hidroxitriptamina, histamina, neuropéptido Y, somatostatina, VIP, purinas y galanina.<sup>84</sup>



**Figura 8.** Inflamación neurogénica estéril.

Se postula que el CGRP está implicado en múltiples procesos fisiopatológicos de la migraña: vasodilatación de los vasos cerebrales y de la duramadre, liberación de mediadores inflamatorios a través de

estimulación de los mastocitos y transmisión de información nociceptiva desde los vasos intracraneales al sistema nervioso.<sup>85</sup>

El CGRP es el péptido vasodilatador más potente, con una capacidad vasodilatadora diez veces superior a las prostaglandinas y 2-3 veces superior a otros vasodilatadores clásicos como la acetilcolina, la adenosina o la SP.<sup>86</sup> La acción vasodilatadora es consecuencia de la estimulación directa de las células musculares de las paredes de los vasos sanguíneos o de la estimulación del endotelio y la liberación de NO.<sup>78</sup> Existe una interacción entre los mecanismos vasoconstrictores (regulados por acción de la noradrenalina) y los vasodilatadores (mediados por el CGRP).<sup>87</sup>

Hasta la fecha el CGRP es la molécula implicada con mayor consistencia en la activación del sistema trigeminovascular. Esta observación se apoya en el hecho de que la infusión intravenosa de CGRP induce cefaleas tardías de características migrañosas<sup>88</sup> y el tratamiento con triptanes hace desaparecer la cefalea y reduce los niveles de CGRP. La infusión intravenosa de NO produce cefalea de características similares a la migraña y un aumento de los niveles de CGRP, que guarda relación con la intensidad de la cefalea.<sup>89</sup> Otros estudios sin embargo, no han podido constatar el aumento de CGRP tras cefalea inducida por NO en sujetos sanos.<sup>90</sup>

Diversos estudios han analizado los niveles de CGRP en pacientes con migraña, con resultados contradictorios: dos estudios demuestran aumento de CGRP en sangre extraída de la vena yugular ipsilateral al dolor durante las crisis de migraña<sup>91,92</sup> mientras que un tercer estudio no encuentra diferencias.<sup>93</sup> Debido a la dificultad para extraer muestras sanguíneas de la vena yugular, distintos grupos han medido

los niveles de CGRP en sangre periférica en pacientes con migraña. En estos estudios han encontrado niveles elevados de CGRP durante las crisis de migraña, en comparación con pacientes sanos, en muestras extraídas a nivel de la vena cubital.<sup>94,95</sup> Asimismo se han observado niveles elevados de CGRP en pacientes con migraña durante período interictal.<sup>96,97</sup> Estos datos son concordantes con otros resultados obtenidos al medir los niveles de CGRP en muestras de saliva durante las crisis de migraña.<sup>98,99</sup> Recientemente Pascual et al. han demostrado niveles elevados de CGRP en sangre periférica en pacientes con migraña crónica en períodos intercríticos.<sup>100</sup>

La ergotamina y los triptanes son capaces de inducir la remisión de los ataques de migraña por diversos mecanismos que incluyen la vasoconstricción de las arterias intracraneales dilatadas, la disminución de la liberación de CGRP desde las terminaciones nerviosas trigeminales perivasculares o la inhibición de la transmisión nociceptiva.<sup>101</sup> Las terminaciones trigeminales presinápticas expresan receptores de 5HT 1B/1D/1F, lo que apoyaría la existencia de un efecto inhibitorio de los triptanes a nivel presináptico, reduciendo la liberación de neuropéptidos inflamatorios.<sup>102</sup> Debido a la unión no específica de estos fármacos a los receptores 1B y 1D se produce una vasoconstricción a nivel sistémico, por lo que estos fármacos deben de evitarse en pacientes con enfermedades cardiovasculares o ictus. Como alternativa se han diseñado fármacos antagonistas de los receptores de CGRP: el olcegepant (BIBN 4096 BS) y el telcagepant (MK-0974) han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la migraña sin efectos vasoconstrictores<sup>103</sup>, aunque se ha constatado un aumento de las enzimas hepáticas con éste último.<sup>104</sup>

Estudios en cultivos celulares han demostrado que el topiramato, fármaco empleado como tratamiento preventivo de la migraña, puede inhibir la liberación de CGRP desde neuronas trigeminales y que éste podría ser su mecanismo de acción para evitar la aparición de las crisis de migraña.<sup>105</sup>

Un estudio reciente de Pascual et al., realizado en pacientes con migraña crónica, ha demostrado que los sujetos que responden al tratamiento con toxina botulínica tipo A presentan menores niveles de CGRP en sangre periférica que los no respondedores.<sup>106</sup> Estos resultados son consistentes con la posibilidad de que la eficacia de la toxina botulínica tipo A se deba a una inhibición de la liberación de CGRP.

### Endotelina-3

La endotelina-3 (ET-3) es una proteína miembro de la familia de las endotelinas (se incluyen la tipo 1, 2 y 3), péptidos vasoactivos con una amplia variedad de funciones biológicas. La endotelina 1 ejerce una acción principalmente vasoconstrictora y es sintetizada tanto en el endotelio como en las neuronas y células gliales, mientras que la ET-3 tiene una acción vasodilatadora al unirse al receptor EDNRB (receptor tipo B de la endotelina) presente en la pared vascular y es sintetizada en las neuronas y las células gliales.

La liberación de ET-3 desde las terminaciones sensitivas trigeminales durante una crisis de migraña induce permeabilidad vascular a nivel de la duramadre y los vasos sanguíneos cerebrales por medio del receptor EDNRB presente en las células endoteliales. La estimulación de estos receptores resulta en una extravasación de las

proteínas plasmáticas que promueven la inflamación neurogénica y la vasodilatación inducida por NO.<sup>107,108</sup>

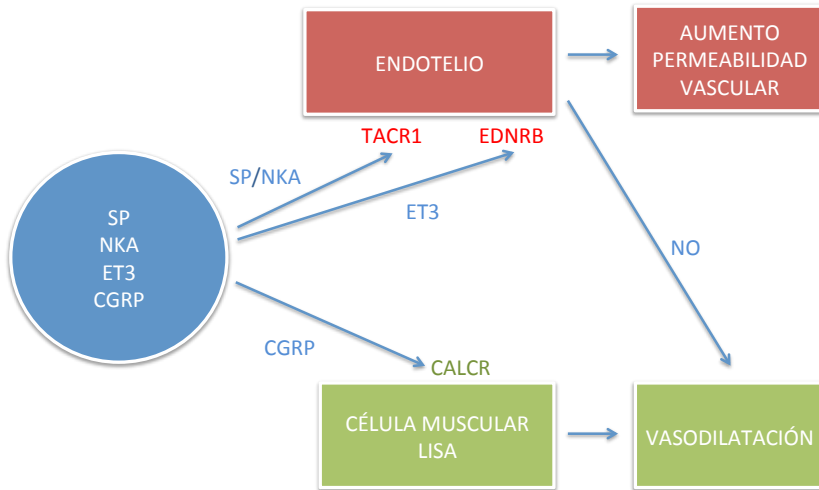
### **Péptido intestinal vasoactivo**

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es una hormona polipeptídica de la familia de la secretina, producida en diferentes estructuras del organismo, con actividad parasimpática. En el sistema nervioso central se sintetiza a nivel del núcleo supraquiasmático del hipotálamo y su acción es promover la vasodilatación de las arterias cerebrales y durales.

Al igual que el CGRP, VIP se considera un mediador de la inflamación neurogénica de la migraña. Mientras que el CGRP se libera desde las terminaciones nerviosas trigeminales aferentes, el VIP procede de las terminaciones parasimpáticas eferentes.<sup>109</sup> Administrado a pacientes con migraña induce una vasodilatación de las arterias, pero no cefalea.<sup>110</sup> Esto sugiere que la vasodilatación podría ser un epifenómeno no necesario, ni suficiente para desencadenar una crisis de migraña.<sup>111</sup> En estudios de experimentación animal se ha comprobado que la estimulación del ganglio trigeminal produce un aumento del flujo cerebral y estimula la liberación de VIP.<sup>112</sup> El VIP se libera preferentemente en las regiones cerebrales anteriores y éste hecho podría conferir una mayor susceptibilidad para la aparición del fenómeno de DCP en las regiones posteriores del cerebro. Recientemente se ha publicado un estudio que encuentra niveles elevados de VIP en sangre periférica en pacientes con migraña crónica durante el período interictal.<sup>113</sup>

### Sustancia P y Neurokinina A

La sustancia P (SP) y la Neurokinina A (NKA) pertenecen a la familia de las taquininas. La NKA es un neuropéptido que participa en procesos de vasodilatación y extravasación proteica. La SP es uno de los neuromoduladores y neurotransmisores más importantes del cerebro. Se libera desde las terminaciones nerviosas trigeminales junto al CGRP y se une de forma preferente al receptor 1 de la neuroquinina (NK-1) participando tanto en la vasodilatación como en el incremento de la permeabilidad vascular. A concentraciones elevadas es capaz de estimular la liberación de metaloproteasas de matriz (MMP) mientras que a bajas concentraciones disminuye su presencia. En el endotelio existen receptores para la taquinina 1 (TACR1) que se activan tanto por sustancia P como por NKA (figura 9). Su estimulación condiciona un aumento de la permeabilidad vascular responsable de la extravasación proteica.<sup>114</sup> En estudios de experimentación animal se ha comprobado que los animales *knockout* para TACR1 no son capaces de generar una respuesta inflamatoria a estímulos con SP, NKA y ET-3.<sup>115</sup> La estimulación del ganglio del trigémino tanto en humanos como en animales de experimentación incrementa la liberación de SP y CGRP.



**Figura 9.** Inflamación neurogénica.

No se han observado incrementos de ninguna de estas sustancias (ET-3, VIP, SP y NKA) en sangre venosa extraída de la vena yugular durante las crisis de migraña y los fármacos antagonistas de su acción no han resultado eficaces en el tratamiento de la migraña.<sup>116,117</sup>

### 1.3.2.2. Biomarcadores de inflamación sistémica

#### Factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) es una interleucina pro-inflamatoria con multitud de funciones. Su papel fundamental es regular el sistema immune, aunque también interviene en la coagulación, metabolismo de lípidos, proliferación celular y apoptosis.

Distintos autores han determinado los niveles de TNF-alfa en pacientes con migraña tanto en período ictal como interictal. Recientemente se ha realizado una revisión sistemática sobre la importancia de estos marcadores en la migraña tanto durante períodos intercríticos como durante las crisis de migraña.<sup>118</sup>

Un estudio realizado durante el período interictal en mujeres premenopáusicas con migraña demostró una correlación entre los niveles de TNF-alfa y la frecuencia de las crisis, el índice de masa corporal y PCR.<sup>119</sup> En contraposición otros estudios realizados con tamaños muestrales pequeños no encontraron diferencias entre el grupo de pacientes con migraña y el grupo control, tanto en adultos<sup>120-122</sup> como en niños.<sup>123</sup> Los estudios realizados durante las crisis de migraña demuestran niveles elevados de TNF-alfa.<sup>120,124</sup> Estos hallazgos sugieren que durante las crisis de migraña se produce una inflamación sistémica promovida por la liberación de citocinas en respuesta a la liberación de neuropeptidos inflamatorios desde las terminaciones nerviosas trigeminales.

### **Interleucina 6**

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina sintetizada sobre la zona de inflamación o tejido dañado y es uno de los principales inductores de los reactantes de fase aguda. Además juega un papel en la transición de inflamación aguda a crónica.<sup>119</sup>

Los estudios realizados durante la fase interictal sugieren que los pacientes con migraña presentan una elevación de los niveles de IL-6<sup>118,121,122,125</sup> y se correlacionan con la frecuencia de las crisis, el índice de masa corporal y los niveles de PCR.<sup>118</sup> Un estudio realizado durante

el período ictal demostró un aumento de IL-6 en vena yugular durante las dos primeras horas tras el inicio de la crisis.<sup>124</sup>

### **Interleucina 10**

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria que actúa inhibiendo la síntesis de otras citocinas pro-inflamatorias como IL-1beta, IL-6 y TNF-alfa.<sup>126</sup> Un estudio realizado en el período interictal detectó niveles disminuídos de IL-10 en pacientes con migraña con respecto al grupo control<sup>120</sup>, mientras que en otro estudio no se encontraron diferencias significativas.<sup>121</sup> Otros dos estudios objetivaron mayores niveles de IL-10 durante las crisis que en el período intercrítico.<sup>120,127</sup>

### **Proteína C-reactiva**

La proteína C-reactiva (PCR) es un reactante de fase aguda que pertenece a la superfamilia de las pentraxinas. Es liberada por el hígado y tejido adiposo fundamentalmente en respuesta al estrés<sup>128</sup> y está implicada en la activación del sistema de complemento y en la expresión de metaloproteasas de matriz del endotelio.<sup>129</sup> Además al interactuar con receptores Fc promueve la producción de citocinas inflamatorias.<sup>130</sup> Podemos encontrar elevación de este reactante de fase aguda en varias patologías, entre ellas las enfermedades cardiovasculares.<sup>131-133</sup>

Los resultados de los niveles de PCR en pacientes con migraña son dispares. En cuatro estudios encontraron una relación entre elevación de la PCR y migraña.<sup>134-137</sup> En el estudio CAMERA la PCR estaba elevada en pacientes migrañosos, particularmente en mujeres con migraña con

aura y se observó una correlación entre los niveles de PCR, la frecuencia y la duración del aura.<sup>138</sup> Otro estudio realizado sobre una gran población demostró que la PCR se elevaba en niños y adolescentes con cefalea<sup>139</sup> y en ancianos.<sup>140</sup> Por el contrario, tres estudios realizados con pequeños tamaños muestrales no encontraron relación entre migraña y PCR<sup>119,141,142</sup>, aunque el tamaño de la muestra pudo ser un factor limitante. Finalmente un estudio llevado a cabo en Reikiavik, sobre una amplia población, observó que los niveles de PCR no aumentaban en pacientes con migraña, aunque existía una clara tendencia a presentar una elevación de la PCR en el grupo de mujeres jóvenes con migraña sin aura.<sup>143</sup>

### **1.3.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y MIGRAÑA**

#### **1.3.3.1. Endotelio y disfunción endotelial**

El endotelio vascular es un órgano indispensable en la regulación del tono y la homeostasis del sistema circulatorio. Es un epitelio plano simple constituido por células endoteliales que recubre el interior del árbol vascular: arterias, venas, vasos linfáticos, capilares y cavidades cardíacas. Las células endoteliales descansan sobre una membrana basal, y ésta a su vez, sobre tejido conjuntivo. El endotelio cubre una superficie de aproximadamente 5000 m<sup>2</sup> y en conjunto pesa unos 3 kg de peso. Constituye una barrera semipermeable entre la luz del vaso y el resto de la pared vascular y su morfología aplanada reduce la turbulencia del flujo sanguíneo.<sup>144</sup>

Su localización estratégica le permite detectar precozmente cambios en diferentes factores hemodinámicos (presión, fuerzas de

cizallamiento) y señales extracelulares (sustancias vasoactivas), que generan una cascada de señales intracelulares que promueven la activación de genes y liberación de sustancias biológicamente activas autocrinas y paracrinas. La liberación equilibrada de estas sustancias lo convierte en el regulador más importante de la homeostasis vascular.<sup>145</sup>

Además de comportarse como una barrera semipermeable, presenta otras funciones, como el mantenimiento del tono vascular, la angiogénesis, la regulación de adhesión leucocitaria y plaquetaria, la regulación de la trombosis y fibrinólisis y la mediación de la inflamación.<sup>146</sup> La pérdida de estas funciones es lo que conocemos como disfunción endotelial.<sup>147</sup>

La disfunción endotelial consiste en una alteración de la estructura y/o función del endotelio por una agresión vascular continuada. La exposición a diversos factores de riesgo vascular, tanto los clásicos (hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, tabaquismo, edad, etc.) como otros más recientemente descritos (hiperhomocisteinemia, estrés oxidativo, infecciones, inflamación sistémica, déficit de estrógenos, factores locales, predisposición genética, etc.), precipita la disfunción endotelial, caracterizada por vasoespasmo, vasoconstricción, alteración de los mecanismos de coagulación y fibrinólisis, e incremento de la proliferación vascular, generándose una respuesta inflamatoria que se cronifica y acaba produciendo aterosclerosis, trombosis y, finalmente, un evento vascular.<sup>148</sup> La disfunción endotelial constituye el origen del proceso aterosclerótico, y puede detectarse de forma precoz y tratarse, ya que es un proceso reversible.<sup>149</sup>

Existen distintos métodos que nos permiten detectar y cuantificar el grado de disfunción endotelial. Estos incluyen marcadores moleculares y ultrasonográficos (tabla 8).

MARCADORES ENDOTELIAL	DE	FUNCIÓN	
<b>BIOMARCADORES ENDOTELIAL</b>	<b>DE</b>	<b>DISFUNCIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropartículas endoteliales</li> <li>• ADMA</li> <li>• Endotelina 1</li> <li>• Pentraxina 3</li> <li>• sTWEAK</li> </ul>
<b>BIOMARCADORES ENDOTELIAL</b>	<b>DE</b>	<b>REPARACIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células progenitoras endoteliales</li> </ul>
<b>MARCADORES NEUROSONOLÓGICOS DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatación dependiente de endotelio</li> </ul>

Tabla 8. Marcadores de la función endotelial.

### 1.3.3.2. Biomarcadores de disfunción endotelial

#### Micropartículas endoteliales

Las micropartículas endoteliales (EMPs) circulantes constituyen un marcador de disfunción endotelial. Las micropartículas son vesículas liberadas por el endotelio en respuesta a diversos estímulos (activación o daño celular, apoptosis). La cantidad de micropartículas circulantes se correlaciona con el grado de disfunción endotelial.<sup>150,151</sup> No se conoce exactamente el mecanismo que las genera, pero estudios realizados en cultivos celulares han demostrado que el endotelio promueve su liberación en respuesta a citocinas inflamatorias. Las EMPs estimulan a su vez al endotelio y generan citocinas inflamatorias

que atraen a leucocitos hacia la pared del endotelio, favoreciendo la inflamación y la trombosis.<sup>149</sup> Las EMPs inhiben al enzima óxido nítrico sintetasa (NOs), provocando una disminución de la reactividad y rigidez de los vasos sanguíneos. Un estudio reciente realizado en mujeres en la premenopausia demostró que las que tenían migraña con aura presentaban niveles elevados de EMPs, y además que dichos niveles se correlacionaban con el grado de rigidez de los vasos, determinado mediante tonometría.<sup>152</sup>

### **Dimetil arginina asimétrica**

La dimetil arginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor endógeno de la NOs. Los niveles elevados de ADMA se han asociado a estrés oxidativo, disfunción endotelial, aterosclerosis y patología cardiovascular.<sup>153</sup> Un estudio realizado en pacientes migrañosos durante el período interictal no encontró diferencias en los niveles plasmáticos de ADMA y NO entre el grupo migraña y control.<sup>154</sup> Sin embargo, un segundo estudio sí detectó niveles elevados de ADMA y NO en pacientes con migraña con respecto al grupo control, aunque no encontró diferencias entre el período ictal e interictal.<sup>155</sup>

### **Endotelina 1**

La endotelina 1 (ET-1) es un péptido de la familia de las endotelinas, producido por el endotelio, que regula el tono vascular. Su función principal es promover la vasoconstricción, actuando sobre las células musculares lisas. Además ET-1 se une a los receptores ET tipo B en el endotelio, regulando la vasodilatación mediada por NO.

Los resultados de los estudios realizados sobre pacientes con migraña en el período interictal son contradictorios. Tres estudios mostraron elevación de ET-1 en pacientes con migraña con respecto a controles<sup>156-158</sup>, a diferencia de otro estudio que detectó niveles disminuídos de ET-1 en pacientes con migraña.<sup>159</sup>

Durante las crisis de migraña cuatro de los cinco estudios realizados constataron una elevación de ET-1.<sup>158,160-163</sup>

### **Pro-péptido natriurético cerebral**

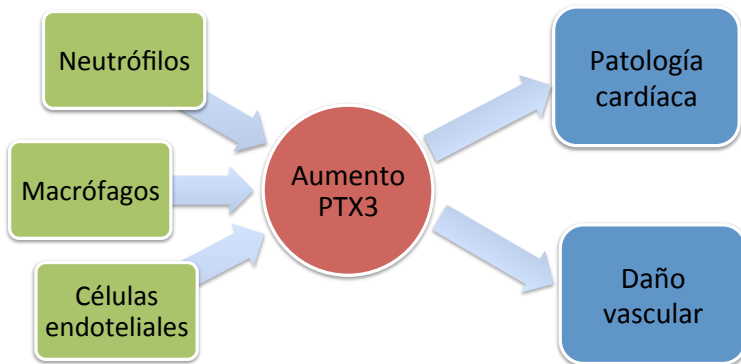
El pro-péptido natriurético cerebral (pro-BNP) es una neurohormona secretada por los ventrículos del corazón en respuesta a la expansión de volumen y sobrecarga de presión. Esta hormona inhibe el sistema nervioso simpático y al sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Un estudio demostró una elevación de pro-BNP en pacientes con migraña en comparación con el grupo control.<sup>122</sup>

### **Pentraxina 3**

La pentraxina 3 (PTX3) es una glicoproteína que forma parte de la superfamilia de las pentraxinas, concretamente de las pentraxinas largas. Dentro de esta superfamilia también se encuentra la PCR, una de las pentraxinas cortas clásicas utilizada como marcador de daño cardiovascular.<sup>164</sup> PTX3 se expresa en células endoteliales, células muculares lisas, macrófagos, fibroblastos o células dendríticas<sup>165</sup> en respuesta a señales inflamatorias (IL-1beta y TNF-alfa).<sup>165,166</sup> En contraste con la PCR, que es sintetizada principalmente en el hígado y por tanto refleja la inflamación sistémica, la PTX3 se sintetiza a nivel

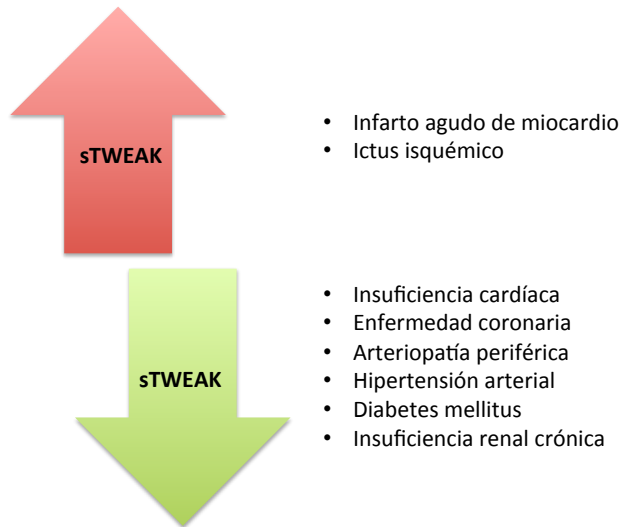
local, en el sistema vascular, por lo que se cree que refleja la inflamación del endotelio y por tanto constituye un marcador de disfunción endotelial.<sup>166,167</sup> En los últimos años varios grupos han examinado el papel de la PTX3 en distintas situaciones clínicas y sugieren que es un potencial biomarcador de enfermedad cardiovascular, como ocurre en la enfermedad aterosclerótica o en el infarto agudo de miocardio<sup>165,168</sup> (figura 10). Un estudio señala que la función endotelial evaluada mediante vasodilatación dependiente de endotelio se correlaciona con los niveles de PTX3 en plasma en pacientes con enfermedad coronaria.<sup>166</sup> Hasta la fecha no existen estudios que hayan determinado los niveles de PTX3 en pacientes con migraña.



**Figura 10.** PTX3 como marcador de patología cardiovascular .

### ***Tumor necrosis factor-like weak inducer factor (TWEAK)***

El *tumor necrosis factor-like weak inducer factor* (TWEAK) es una citocina miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Inicialmente se expresa como una proteína tipo II transmembrana (mTWEAK), pero una pequeña parte puede ser liberada a la circulación sistémica en forma soluble (sTWEAK), que es la forma biológicamente activa.<sup>169,170</sup> TWEAK se expresa de forma ubicua en varios órganos y tejidos, incluyendo corazón, pulmón y endotelio.<sup>169,171</sup> TWEAK aumenta la expresión y secreción de diversas proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria: prostaglandina E2, MMP-1, IL-6 e IL-8.<sup>165</sup> Se considera una citocina multifactorial, cuyos efectos dependen del tipo celular y del contexto.<sup>172,173</sup> Puede inducir la muerte o supervivencia celular, promover la actividad inflamatoria y angiogénica o regular el destino de las células progenitoras. En los últimos años diferentes autores han investigado la asociación entre sTWEAK y las enfermedades cardiovasculares.<sup>168</sup> Casi todos los estudios disponibles han constatado niveles bajos de sTWEAK en pacientes con enfermedad cardiovascular (concretamente en la insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria, arteriopatía periférica e hipertensión arterial), así como en la diabetes y la insuficiencia renal crónica (figura 11).



**Figura 11.** sTWEAK como marcador de enfermedad cardiovascular.

En base a estos resultados se postula que los niveles reducidos de sTWEAK podrían servir como un nuevo biomarcador de aterosclerosis.<sup>169,173</sup> Una de las teorías existentes para explicar el descenso de sTWEAK en las enfermedades cardiovasculares es que esta citocina juega un papel antiinflamatorio.<sup>169</sup> A la inversa, se ha informado de que en el ictus isquémico aumenta la expresión de sTWEAK por inducción de apoptosis neuronal y ruptura de la BHE.<sup>171</sup> Todavía no disponemos de datos sobre el papel de sTWEAK en la migraña.

### 1.3.3.3. Biomarcadores de reparación endotelial

#### Células progenitoras endoteliales

Las células progenitoras endoteliales (EPCs) son células primitivas oligopotenciales derivadas de la médula ósea con capacidad de

proliferación, migración y diferenciación hacia diversas estirpes celulares de la etapa adulta, que sirven para reparar el daño en los distintos tejidos.<sup>174</sup> Diversos autores han encontrado una reducción de EPCs circulantes en pacientes con migraña. El primer estudio, publicado por Lee, demostró que los pacientes con migraña, sobre todo migraña con aura, presentan menores niveles de EPCs comparado con pacientes con cefalea tensional.<sup>175</sup> Rodríguez-Osorio et al. encontraron una reducción de EPCs en pacientes con migraña durante el período interictal.<sup>95</sup> Estos resultados sugieren que los pacientes con migraña presentan una alteración en la función endotelial. El tercer estudio publicado incluyó a pacientes con migraña episódica, migraña crónica y controles.<sup>176</sup> En este estudio evaluaron el número EPCs y su capacidad de producir unidades formadoras de colonias (CFUs), clasificando a las EPCs como “precoces” o “tardías”. Los autores no encontraron diferencias en cuanto al número de EPCs entre los tres grupos, pero sí detectaron que el grupo control presentaba un menor número de EPCs maduras (marcador de daño y reparación vascular).<sup>176</sup>

#### **1.3.3.4. Marcadores neurosonológicos de disfunción endotelial Vasodilatación mediada por hiperaflujo**

La cuantificación del grado de vasodilatación en diferentes territorios vasculares en respuesta a un estímulo fisiológico (fuerza de cizallamiento) o farmacológico (acetilcolina) ofrece la ventaja de poder detectar una alteración funcional precoz frente a otros marcadores que sólo detectan cambios estructurales.

La vasodilatación como respuesta al estrés de cizallamiento generado por el hiperaflujo vascular se produce en muchos vasos sanguíneos de la circulación. Esta respuesta fue descrita por primera vez en el año 1933 por Schretzenmayer<sup>177</sup> y se ha denominado vasodilatación mediada por hiperaflujo. El incremento temporal del flujo vascular se consigue liberando el vaso de una oclusión temporal que podemos conseguir mediante un esfingomanómetro (hiperemia reactiva) que provoca un aumento temporal en el estrés por cizallamiento en dirección perpendicular a la corriente de flujo sanguíneo.<sup>178</sup> Esto supone un estímulo mecánico reconocido por el endotelio vascular, que provoca la apertura de los canales de potasio existentes en la célula endotelial. Esta apertura de los canales de potasio produce una hiperpolarización de la célula endotelial que genera la entrada de calcio. El calcio activa a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), encargada de producir NO<sup>179</sup>, que difunde hacia las células musculares lisas adyacentes, y allí activa a la guanilato ciclasa soluble para aumentar los niveles de GMP cíclico. El GMP cíclico genera finalmente la relajación de la fibra muscular lisa y consecuentemente la vasodilatación. Además, cambios mantenidos durante minutos inducen la fosforilación de la eNOS por la vía de la serina-tronina-proteincinasa<sup>180</sup>, mientras que si se mantienen durante días activan la transcripción de la eNOS.<sup>181</sup> Una menor respuesta de vasodilatación refleja una menor producción o biodisponibilidad de NO por parte de las células endoteliales y, por tanto, la existencia de disfunción endotelial. En resumen, esta respuesta de vasodilatación mediada por hiperaflujo es dependiente del NO endotelial, por lo que se trata de una

vasodilatación dependiente del endotelio (VDE), que disminuye en condiciones patológicas (disfunción endotelial).

La VDE se ha demostrado en grandes arterias de la circulación periférica, como la arteria braquial, radial o femoral.<sup>182,183</sup> La fuerza de cizallamiento depende del diámetro del vaso (fuerza de cizallamiento = viscosidad x velocidad / diámetro), de tal forma que para el mismo estímulo compresivo, ésta será menor cuanto mayor sea el diámetro del vaso; por ello, puede resultar complicado cuantificar el grado de vasodilatación en arterias mayores de 5 mm. En este sentido la arteria braquial es la más empleada, y su técnica ha sido validada y estandarizada.<sup>184-186</sup>

Existen otros factores que también pueden influir en la VDE (tabla 9): la edad (incremento del diámetro vascular y alteración de la función endotelial), el sexo (diámetro vascular menor en mujeres y mayores niveles de estrógenos que condicionan una mejor respuesta), el período del ciclo menstrual (variaciones en los niveles de estrógenos), la hora del día (variaciones de la VDE con el ritmo circadiano), condiciones técnicas de la sala (temperatura de la sala, posición del miembro a explorar, duración de la oclusión, realización de ejercicio con la mano de la extremidad a explorar), condiciones físicas (el ayuno, la realización del ejercicio aeróbico ligero previo que favorecería una mejor respuesta), las resistencias vasculares o el daño medular (por condicionar un menor diámetro vascular).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VDE
Estrés de cizallamiento
Edad
Sexo
Ciclo menstrual
Ritmo circadiano
Condiciones técnicas de la sala
Condiciones físicas del paciente
Factores de riesgo vascular
Daño medular

**Tabla 9.** Factores que pueden modificar la VDE.

Definimos la VDE como el porcentaje de cambio entre el diámetro del vaso tras una hiperemia reactiva (D2) y el diámetro en condiciones basales (D1). Así  $VDE = \frac{D2-D1}{D1} \times 100$ .

En personas sanas la VDE en la arteria braquial varía entre el 6-10%. En pacientes que presentan factores de riesgo vascular o patología cardiovascular establecida este porcentaje se reduce o incluso está ausente.<sup>187</sup>

### Vasodilatación dependiente de endotelio y riesgo vascular

La alteración de la VDE ha sido descrita en diferentes estudios como un factor predictor independiente de riesgo vascular a largo plazo en pacientes con enfermedad coronaria o arterial periférica.<sup>188,189</sup> Asimismo se ha constatado su utilidad para predecir el riesgo de reestenosis tras angioplastia coronaria o tras cirugía vascular.<sup>190,191</sup> Recientemente se ha señalado que la VDE actúa como predictor independiente de riesgo cardiovascular en adultos libres de

enfermedad cardiovascular y permite establecer riesgos de posibles eventos vasculares.<sup>192</sup>

En relación con patología cerebrovascular, varios estudios han demostrado una menor respuesta en pacientes con infarto lacunar frente a sujetos con factores de riesgo vascular sin ictus y frente a ictus de otras etiologías.<sup>189-191</sup> Sin embargo, un reciente estudio señala una menor respuesta en pacientes con infarto aterotrombótico frente a aquellos con infarto lacunar.<sup>192</sup> Además existen evidencias de que la VDE se comporta como un buen marcador pronóstico y de recurrencia vascular en pacientes con ictus isquémico.<sup>182,191</sup>

### **Vasodilatación dependiente de endotelio y migraña**

Existe asociación entre migraña, particularmente la migraña con aura, y enfermedades cardiovasculares. Tres metaanálisis confirman la asociación entre migraña e ictus isquémico, y sugieren que los pacientes con migraña tienen el doble de riesgo de sufrir un infarto cerebral<sup>197-199</sup>, concretamente las mujeres con migraña con aura. Por ello, señalan que la migraña con aura es un factor de riesgo independiente para ictus isquémico. Recientemente también se ha encontrado que la migraña con aura está asociada a lesiones hiperintensas en la sustancia blanca<sup>200</sup> y un estudio prospectivo constata que existe asociación entre eventos cardíacos y mujeres con migraña con aura.<sup>201</sup> Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos son todavía desconocidos. Existen varias teorías, una de las cuales apunta que los pacientes con migraña con aura presentan disfunción endotelial.

Hasta la fecha seis estudios han evaluado la función endotelial en pacientes con migraña mediante VDE con resultados dispares. Un estudio encontró una disminución de la VDE en sujetos con migraña comparado con sujetos sanos<sup>202</sup> y establece la hipótesis acerca de una posible afectación local en la migraña en el contexto de alteraciones vasomotoras presentes de forma sistémica. En otros cuatro estudios no observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con migraña con aura, migraña sin aura y controles.<sup>95,158,203,204</sup> A diferencia de los anteriores, un estudio encontró aumento de la VDE en pacientes con migraña con aura con respecto a migraña sin aura y controles.<sup>205</sup> Uno de los argumentos que sostiene este último estudio para explicar sus hallazgos frente a las evidencias previas es que utilizaron una sonda de mayor frecuencia (14 MHz frente a 7,5-10MHz). En todos los estudios excepto en de Rodríguez-Osorio et al.<sup>95</sup> evaluaron a los pacientes en el período intercrítico.

#### **1.3.4. DISRUPCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y DAÑO NEURONAL EN LA MIGRAÑA**

Existen evidencias de que en la migraña se produce una disrupción de la BHE y un daño neuronal secundario a la repetición de las crisis.

##### **1.3.4.1. Biomarcadores de disrupción de la barrera hematoencefálica**

###### **Metaloproteasas**

Las metaloproteasas de matriz (MMP) son una extensa familia de enzimas proteolíticas involucradas en la remodelación tisular y degradación de la matriz extracelular. Las MMPs están ampliamente

distribuidas en el cerebro y regulan diversos procesos incluyendo la activación microglial, la inflamación, la apoptosis y la disrupción de la BHE. La sobreexpresión y aumento de actividad de estas enzimas se ha implicado en varios trastornos neurológicos.

Estudios en modelos animales han demostrado que tras la generación del fenómeno de la depresión cortical propagada se produce una disrupción de la BHE y elevación de metaloproteasa-9 (MMP-9).<sup>206</sup> Esta misma elevación ha sido observada durante las crisis de migraña con y sin aura.<sup>207</sup> Se especula con la posibilidad de que esta alteración pueda ser secundaria a la disfunción endotelial.

### **Fibronectina celular**

La fibronectina celular es una glicoproteína que pertenece a la familia de las fibronectinas, proteínas adhesivas que promueven interacciones entre células o entre células y matriz extracelular.<sup>208</sup> Existen dos formas de fibronectina: la fibronectina plasmática, forma soluble dimérica secretada por los hepatocitos directamente a la circulación, y la fibronectina celular (cFn), forma multimérica sintetizada principalmente por células endoteliales y ensamblada en la matriz extracelular.<sup>209</sup> Debido a que cFn se encuentra en la matriz extracelular que conforma la lámina basal de la BHE, la elevación de los niveles de esta proteína en plasma podrían ser indicativos de una pérdida de la integridad de la BHE. De hecho, se ha detectado elevación de los niveles plasmáticos de cFn en pacientes con ictus isquémico<sup>210</sup>, transformación hemorrágica tras tratamiento trombolítico en el ictus isquémico agudo<sup>211</sup> y daño cerebral de origen postraumático.<sup>212</sup> Hasta

la fecha ningún estudio ha determinado los valores de cFn en pacientes con migraña.

#### **1.3.4.2. Biomarcadores de daño cerebral**

##### **S100**

S100 es una proteína moduladora del calcio, sintetizada y liberada principalmente por las células gliales en el SNC.<sup>213</sup> En condiciones normales circula en plasma en concentraciones muy bajas, pero aumenta con el daño o la activación glial en respuesta a estímulos inflamatorios.<sup>214,215</sup> La sobreexpresión de S100 provoca a su vez un aumento de citocinas pro-inflamatorias, liberadas por las células gliales, que pueden provocar el daño y la muerte neuronal. Asimismo, se ha constatado que S100 tiene propiedades neurotóxicas en sí misma. Recientemente, un estudio realizado en modelos in vivo demostró que la activación de sistema trigeminal provocaba un aumento en la expresión de la proteína inflamatoria S100 en neuronas y células gliales.<sup>216</sup> Estos hallazgos sugieren que el aumento de la actividad S100 contribuye a la sensibilización periférica y al mantenimiento de dolor.

Varios estudios han evaluado los niveles séricos de proteína S100 en pacientes con migraña. En uno ellos analizaron los niveles de S100 en niños con cefalea y encontraron que los valores en suero eran significativamente mayores en los pacientes con migraña que con cefalea tensional.<sup>217</sup> Teepker et al. también constataron que los niveles séricos de S100 aumentaban en los pacientes con migraña durante el período ictal e interictal.<sup>218</sup> En el 2011 Yilmaz et al. observaron un aumento de los niveles séricos de S100 de forma significativa durante el período ictal e interictal, en un grupo de pacientes con migraña sin

aura.<sup>219</sup> Sin embargo un estudio realizado en 2014 por los mismos autores objetivó un descenso de los niveles de S100 en los pacientes con migraña con y sin aura, durante el período interictal.<sup>220</sup>

### **Enolasa neuronal específica**

La enolasa neuronal específica (ENE) es una proteína que se encuentra en las neuronas, sistema nervioso periférico y células neuroendocrinas.<sup>221</sup> Los niveles de ENE se encuentran elevados en algunos tipos de cáncer, traumatismo craneoencefálico, daño cerebral tras cirugía cardíaca e ictus isquémico, y pueden ser utilizados como marcador de daño neuronal.<sup>222-225</sup>

Hay pocos estudios publicados sobre ENE y migraña. Teepker et al. detectaron niveles disminuidos de ENE en pacientes con migraña, con y sin aura, tanto en período interictal como ictal.<sup>218</sup> Por el contrario, Yilmaz et al., que evaluaron los niveles de ENE en pacientes con migraña sin aura durante el período ictal e interictal<sup>219</sup>, constataron niveles elevados de ENE únicamente durante las crisis de migraña.

#### **1.4. NEUROIMAGEN Y MIGRAÑA**

Se considera que la migraña es una patología benigna, que no ocasiona alteraciones a nivel cerebral a largo plazo. Los estudios de resonancia magnética (RM) han demostrado que los pacientes con migraña presentan alteraciones estructurales y funcionales a nivel encefálico.

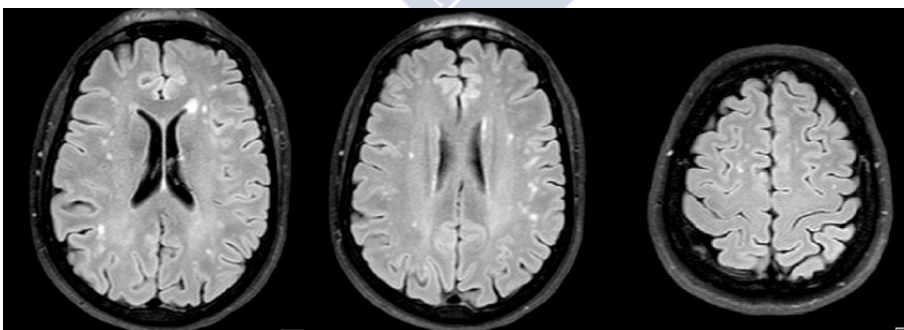
Los estudios de neuroimagen suponen un avance en el conocimiento de las áreas implicadas en la generación del dolor, los

mecanismos fisiopatológicos de la migraña y las posibles “secuelas” de ésta a nivel cerebral. Sin embargo, de todas formas todavía se desconoce cuál es la etiología de estas lesiones y el significado clínico.

#### 1.4.1. Hiperseñales de sustancia blanca

Las hiperseñales de sustancia blanca (HSB) pueden definirse como pequeñas lesiones inespecíficas a nivel encefálico, localizadas en sustancia blanca profunda o periventricular, e hiperintensas en todas las secuencias de RM (figura 12).<sup>226</sup>

Las publicaciones señalan una prevalencia de HSB en la población general entre 11-21% y entre 4-59% en los pacientes con migraña. Los estudios anatomopatológicos han objetivado la presencia de gliosis, desmielinización y pérdida axonal.<sup>227</sup> Se han formulado diferentes teorías para explicar su formación: isquemia secundaria a aterosclerosis de pequeño vaso, asociación con factores de riesgo vascular clásicos, disfunción endotelial, disfunción de la BHE y estrés oxidativo<sup>228-232</sup>, aunque el mecanismo exacto todavía es desconocido.



**Figura 12.** Hiperseñales de sustancia blanca en un paciente con migraña (secuencias FLAIR).

Investigaciones han demostrado la asociación entre migraña y HSB. La primera de ellas fue publicado en el año 1998 por Soges et al.<sup>233</sup> Desde entonces varios estudios clínicos han confirmado esta asociación.<sup>234-236</sup> De los cuatro estudios realizados en la población general, el primero de ellos fue el CAMERA-1 (*Cerebral Abnormalities in Migraine, and Epidemiological Risk Analsis 1*), publicado en el año 2004.<sup>237,238</sup> Los autores investigaron la prevalencia de HSB en 295 pacientes con migraña y 140 controles, y observaron que las mujeres con migraña presentaban más HSB en territorio profundo y a nivel infratentorial que las mujeres sin migraña. Demostraron además que la probabilidad de observar HSB era mayor en aquellos pacientes que tenían una elevada frecuencia de las crisis (> 1 crisis/mes). No observaron relación alguna con la presencia o ausencia de aura. Estos mismos autores realizaron un segundo estudio a los 9 años, el CAMERA-2, intentando demostrar la asociación entre la frecuencia de las crisis de migraña y la progresión de las lesiones estructurales.<sup>239</sup> Únicamente las mujeres con migraña, sobre todo aquellas con migraña sin aura, presentaban una mayor incidencia de HSB en territorio profundo y una mayor progresión de las lesiones que los controles. Dicha progresión no se asociaba a la frecuencia, duración o intensidad de las crisis ni al tratamiento. Estos autores tampoco encontraron una progresión de las hiperseñales a nivel infratentorial ni periventricular.

El estudio francés EVA (*Epidemiology of Vascular Ageing-MRI study*) confirmó la asociación entre migraña y HBS, observando una mayor correlación en pacientes con migraña con aura.<sup>240</sup> Este hallazgo no era específico de los pacientes con migraña, sino que afectaba a todos los pacientes con cefalea, sobre todo cefalea de tipo tensional.

Recientemente el estudio ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities Study*) demostró una asociación entre pacientes con migraña sin aura e HSB y una ausencia de progresión de las lesiones tras 8-12 años de seguimiento.<sup>241</sup>

Un metaanálisis realizado en el año 2013, que no incluye los resultados del estudio ARIC, constató un mayor riesgo de HSB en pacientes con migraña con aura.<sup>206</sup>

Las HSB no son un hallazgo específico de los pacientes con migraña, ya que también se han detectado estas lesiones en otras patologías: deterioro cognitivo, ictus isquémico, alteración de la marcha, incontinencia urinaria y depresión.<sup>228,242-249</sup> Aunque se ha relacionado la existencia de HSB con múltiples factores de riesgo vascular<sup>250,251</sup>, su presencia en pacientes con migraña es independiente de estos factores.<sup>238,239,240</sup> Además se ha sugerido que ciertas patologías asociadas a la migraña pueden contribuir a la aparición de HSB, de modo que los pacientes con hipertiroidismo subclínico, hiperhomocisteinemia, foramen oval permeable o prolapso mitral presentan mayor incidencia de HSB.<sup>253,254</sup>

Un estudio ha demostrado un mayor riesgo de ictus con el aumento del volumen de las HSB<sup>252</sup> pero no se ha demostrado asociación entre HSB y deterioro cognitivo.<sup>239,240</sup>

#### **1.4.2. Lesiones isquémicas silentes**

Las lesiones isquémicas (LIS) se definen como defectos a nivel del parénquima cerebral, mayores de 2 mm, isointensos en todas las secuencias de RM. A nivel supratentorial están rodeados por un borde hiperintenso en secuencias FLAIR. Los espacios de Virchow-Robin se

excluyen como infartos en base a su localización, forma, tamaño y señal.  
237,240

La prevalencia de LIS en la población general varía según el grupo de población seleccionado, la técnica de imagen y la propia definición de infarto. Esta variación se relaciona en gran parte con la edad, de modo que se describe una prevalencia del 10% a los 60 años y del 28% a los 75 años.<sup>255</sup> Las mujeres tienen un mayor riesgo de presentar estas lesiones<sup>256,257</sup>, hasta un 30-40%, pero los hombres tienen más riesgo de sufrir un ictus isquémico sintomático.<sup>258</sup>

Diferentes estudios han constatado un aumento de LIS en pacientes con migraña, localizadas con mayor frecuencia en cerebelo o en ganglios de la base.<sup>237,238,259</sup> Aproximadamente un 10% de pacientes con migraña presentan lesiones isquémicas en territorio posterior, silentes y de naturaleza incierta.<sup>237</sup> Existen múltiples teorías para explicar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Una de las hipótesis propuestas sugiere que estas lesiones se deben a una disfunción del endotelio. La mayoría de los estudios en animales señalan que la circulación de territorio posterior es más susceptible a los cambios vasomotores promovidos por el NO<sup>260</sup> y que los pacientes con migraña tienen menor vasorreactividad, valorada mediante doppler transcraneal, en el territorio posterior tras la infusión de L-arginina (un precursor del NO).<sup>261,262</sup> El estudio CAMERA-1 objetivó un aumento de LIS en pacientes con migraña con aura y con una elevada frecuencia de crisis (>1/mes), únicamente en territorio posterior, la mayor parte localizadas en cerebelo.<sup>237,238</sup> En el estudio EVA detectaron un aumento de LIS en pacientes con migraña con aura, localizadas en ganglios basales, pero no observaron mayor prevalencia

en territorio posterior.<sup>240</sup> En el estudio AGE-RS, en el que realizaron una RM encefálica a los pacientes con migraña 26 años después del diagnóstico inicial, encontraron un aumento de LIS únicamente en mujeres con migraña con aura, la mayor parte localizadas en cerebelo.<sup>259</sup> En el CAMERA-2 no evidenciaron una progresión de las LIS en los pacientes migrañosos.<sup>239</sup> Los autores de esta publicación señalaban además que los pacientes con LIS presentaban un mayor riesgo cardiovascular y una mayor prevalencia de ictus isquémico sintomático. El metaanálisis realizado en el año 2013 no observó un mayor riesgo de LIS en pacientes con migraña con respecto a controles, pero sí lo constató en el grupo de migraña con aura.<sup>206</sup>

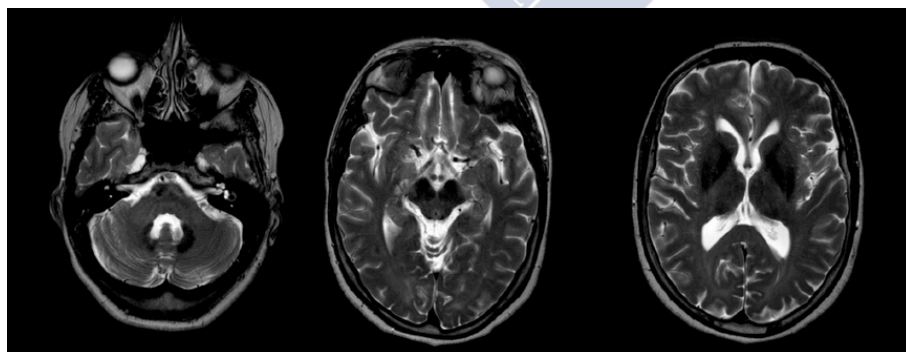
La mayoría de estudios no demostraron asociación entre LIS y riesgo de desarrollar deterioro cognitivo o demencia en la edad avanzada<sup>239,240,263</sup>, a excepción de uno que sí constató su asociación.<sup>263</sup>

#### **1.4.3. Hipointensidades en ganglios basales y tronco cerebral: depósitos de hierro**

Podemos encontrar dos tipos de hierro en el organismo: el hierro hemo, que forma parte de la hemoglobina, mioglobina y citocromo, y el hierro no hemo, que forma parte de multitud de enzimas de metabolismo oxidativo. En condiciones fisiológicas el hierro se encuentra asociado a una proteína (ferritina, transferrina, etc.) ya que en forma de ión libre puede ser tóxico. Esta toxicidad se debe a la habilidad del hierro libre de generar radicales oxidativos que dañan proteínas, ADN y neuronas.<sup>265</sup> Durante el envejecimiento fisiológico, el hierro se acumula en el cerebro unido a la ferritina, principalmente en los ganglios basales.<sup>266</sup> Distintas enfermedades neurodegenerativas,

incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y el síndrome de Hallervorden-Spatz, están asociadas con errores en el metabolismo, el transporte y la homeostasis del hierro.<sup>267-269</sup> La acumulación excesiva de hierro puede causar de forma directa la disfunción de los ganglios basales, al dañar las sinapsis o la síntesis de proteínas. Indirectamente, puede aumentar la vulnerabilidad tisular al estrés oxidativo, tal y como se ha sugerido en la enfermedad de Alzheimer y en la esclerosis múltiple.<sup>268,270</sup> En modelos animales de esclerosis múltiple, Williams et al. demostraron que la inyección estereotáctica de citocinas inflamatorias (TNF-alfa e IFN-gamma) favorecían el depósito de hierro a nivel cerebral.<sup>271</sup>

El hierro es un elemento con propiedades paramagnéticas, lo que induce una reducción de los tiempos de relajación transversal (T2) en resonancia magnética. Por ello, la acumulación de hierro en un tejido determinado se traduce en la inducción de señales hipointensas en imágenes de RM, especialmente visible en secuencias de imagen ponderadas en T2 y especialmente en T2\* (figura 13).



**Figura 13.** Hipointensidades en los ganglios basales y tronco cerebral en un paciente con migraña (secuencias T2).

Los estudios de RM detectan en los pacientes con migraña un aumento de los depósitos de hierro a nivel cerebral. Distintos autores han encontrado acúmulo de hierro en sustancia gris periacueductal (PAG)<sup>272</sup> y ganglios de la base, concretamente en putamen, globo pálido y núcleo rojo<sup>273,274</sup>, en pacientes con migraña menores de 50 años.

Welch et al. examinaron a pacientes con migraña, cefalea crónica diaria y controles, comparando el acúmulo de hierro en secuencias T2, T2\* y T2' en PAG, núcleo rojo y sustancia negra.<sup>272</sup> Encontraron que los pacientes con migraña y cefalea crónica diaria presentaban mayor cantidad de hierro en PAG que los controles y que el acúmulo de hierro en PAG se correlacionaba con el tiempo de evolución de la migraña, independientemente de la edad de los pacientes. No encontraron diferencias en cuanto al tipo de migraña (con/sin aura).

La activación de PAG durante las crisis de migraña ha sido demostrada mediante estudios de PET y RM funcional.<sup>58,69,275,276</sup> De forma similar estudios de fMRI-BOLD y PET han objetivado una activación persistente e hiperemia en la sustancia negra y núcleo rojo, estructuras implicadas en el sistema nociceptivo.<sup>277,278</sup> Dado que la PAG se activa durante los ataques de migraña, Welch et al. sugirieron que los depósitos de hierro son el resultado de la alteración en su homeostasia como consecuencia de la producción de radicales libres durante la hiperemia producida en el ataque de migraña. De este modo la elevación de hierro constituiría un marcador de daño y disfunción neuronal.<sup>279</sup>

Un estudio poblacional realizado en el 2008 por Kruit et al. corroboró los hallazgos de Welch, al demostrar un aumento de los depósitos de hierro en núcleo rojo, putamen y globo pálido en

pacientes con migraña menores de 50 años.<sup>273</sup> Asimismo los pacientes con historia de migraña de mayor tiempo de evolución presentaban un mayor acúmulo de hierro.

Tepper et al. seleccionaron a pacientes con migraña y cefalea crónica diaria, y concluyeron que la hipodensidad en el globo pálido en secuencias T2 permitía distinguir a pacientes con migraña crónica de episódica.<sup>280</sup>

A pesar de todas estas evidencias, todavía se desconoce si el acúmulo de hierro es simplemente una respuesta fisiológica inducida por la activación repetida de estos núcleos implicados en el procesamiento del dolor o si el depósito de hierro podría dañar estas estructuras, contribuyendo a la cronificación del dolor.

#### **1.4.4. Cambios volumétricos en la sustancia gris**

Los cambios volumétricos de sustancia gris se visualizan como una disminución o aumento de volumen / densidad en distintas áreas del cerebro en secuencias T2 y FLAIR de RM. La morfometría basada en vóxel (VBM) es una técnica de análisis de las imágenes de RM, que permite evaluar la morfología de la sustancia gris.<sup>281</sup> Todavía se desconoce el significado de los cambios en la VBM, ya que hallazgos histológicos como la densidad neuronal no se correlaciona con los mapas de VBM de la sustancia gris<sup>282</sup> y cambios en el flujo sanguíneo cerebral pueden condicionar cambios en los mapas de VBM.<sup>283</sup>

Aunque un estudio inicial de VBM en pacientes con migraña no mostraba diferencias significativas<sup>284</sup>, investigaciones más recientes han encontrado diferencias. Schmitz et al. identificaron una reducción de la corteza frontal, parietal y occipital, sistema límbico, ganglios

basales y cerebelo con respecto a controles.<sup>285</sup> Este mismo estudio encontró que los pacientes con alta frecuencia de las crisis (> 3 crisis/mes) y mayor tiempo de evolución de la migraña (> 15 años) presentaban diferencias con respecto a los pacientes con baja frecuencia de las crisis y menor tiempo de evolución.

Otro estudio de VBM realizado por Valfrè W et al. constató que las diferencias estructurales observadas en los pacientes con migraña se asociaban a la frecuencia de las crisis.<sup>286</sup> Los pacientes con migraña crónica y episódica presentaban una reducción de la sustancia gris en el giro temporal superior e inferior y giro precentral en comparación con los controles. Además, los pacientes con migraña crónica presentaban una reducción de la sustancia gris en la corteza cingular anterior, ínsula, amígdala, opérculo parietal y giro frontal medio e inferior. Rocca et al. investigaron mediante VBM si los pacientes con migraña y lesiones de sustancia blanca presentaban cambios en la sustancia gris, comparado con sujetos sanos.<sup>287</sup> Observaron que en los pacientes con migraña había una reducción de la sustancia gris en el lóbulo frontal, temporal y cíngulo, y un aumento de densidad de la sustancia gris periacueductal. Los cambios en sustancia gris se correlacionaban con la edad de los pacientes, duración de las crisis y las lesiones de sustancia blanca.

Estos hallazgos confirman que los pacientes con migraña presentan una reducción de la sustancia gris en áreas corticales implicadas en el sistema nociceptivo, y que estos cambios se correlacionan con el tiempo de evolución de la migraña y la frecuencia de las crisis.



## 2. JUSTIFICACIÓN





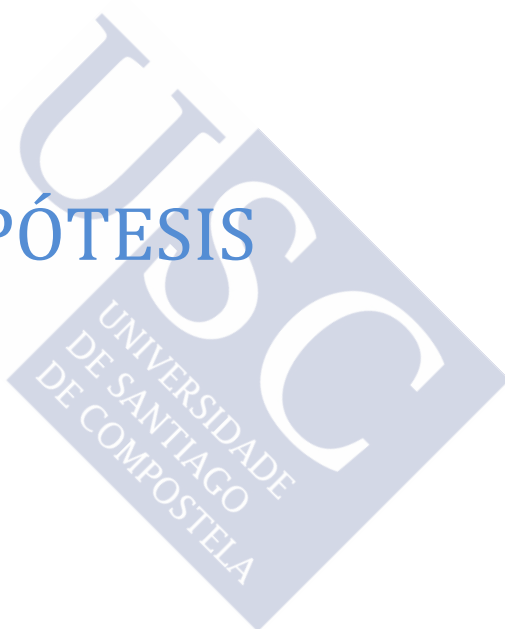
La migraña representa uno de los problemas de salud más frecuentes en la población y genera importantes problemas de calidad de vida y repercusión socio-laboral.

La migraña crónica es la principal complicación evolutiva de la migraña y afecta al 2% de la población. Aunque se han invocado varios factores, no se conoce con exactitud cual es el mecanismo que provoca la cronificación de la migraña. En los últimos años las investigaciones sobre la inflamación neurogénica y sistémica, la disfunción endotelial y de BHE, y el daño neuronal están cobrando cada vez más relevancia.

La demostración de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la cronificación de la migraña abre la posibilidad de nuevas dianas terapéuticas y orienta sobre la necesidad de realizar un tratamiento preventivo más eficaz y continuado para prevenir la cronificación de la misma.



### 3. HIPÓTESIS





La migraña es un trastorno funcional del sistema nervioso central en el que se producen alteraciones neurovasculares de carácter transitorio, sin embargo, la reiteración de las crisis podría llegar a producir un daño permanente a nivel del parénquima cerebral.





## 4. OBJETIVOS





El objetivo del estudio es doble:

3.1. Demostrar que la migraña crónica puede producir alteraciones estructurales permanentes en las imágenes de resonancia magnética.

3.2. Analizar los posibles mecanismos que pueden mediar en este daño cerebral (inflamación, disfunción endotelial, disrupción de barrera hematoencefálica, marcadores de daño neuronal y glial).





## 5. PACIENTES Y MÉTODOS





Se realizó un estudio prospectivo de pacientes con migraña episódica, migraña crónica y controles sanos, a los que se les aplicó un protocolo clínico, bioquímico, neurosonológico y de neuroimagen común. Los datos obtenidos se recogieron en una base de datos diseñada específicamente para este estudio. Este protocolo de estudio de pacientes con migraña ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

### 5.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES

Se seleccionaron de manera prospectiva pacientes diagnosticados de migraña, procedentes de la Unidad de Cefaleas del Servicio de Neurología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y sujetos controles sanos. Se definieron los criterios de inclusión y exclusión previamente al inicio de la recogida de datos. Los sujetos seleccionados cumplían todos los criterios de inclusión y exclusión.

#### 5.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes diagnosticados de migraña crónica y episódica según los criterios de la IHS 2013. También se incluyeron controles sanos que no padecían migraña, ni ningún otro tipo de cefalea.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes mayores de 18 años de edad.
- Pacientes pertenecientes a ambos sexos.

- Pacientes con posibilidad de cumplimiento del protocolo del estudio.
- Pacientes que acceden a participar de forma voluntaria, con aceptación del consentimiento informado, tras proporcionar la información del proyecto.
- No presentar ninguna crisis en las 72 horas previas ni haber realizado consumo de medicación antiinflamatoria/analgésica durante ese período.

#### 5.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se consideraron como criterios de exclusión todos aquellos antecedentes que pudieran interferir con los parámetros de estudio:

- Hipertensión arterial (HTA conocida y tratada con antihipertensivos o  $\geq 2$  registros de TA superiores a 140/90 mmHg).
- Enfermedad coronaria (lesiones coronarias  $> 50\%$  demostradas angiográficamente, infarto de miocardio documentado, angina de pecho, recanalización coronaria).
- Diabetes mellitus (DM conocida y tratada con dieta, fármacos o ambas; glucosa sérica en ayunas mayor de 126 mg/dl en  $\geq 2$  determinaciones).
- Hipercolesterolemia (colesterol plasmático en ayunas  $> 200$  mg/dl o hipercolesterolemia tratada farmacológicamente).
- Enfermedades infecciosas presentes en el momento del estudio.
- Enfermedades inflamatorias de curso crónico.
- Enfermedad sistémica grave.
- Oligomenorrea, polimenorrea u ovario poliquístico.

- Obesidad (índice de masa corporal  $> 35 \text{ kg/m}^2$ ).
- Fumadores activos (en el momento del estudio o en los 12 meses previos).
- Consumo reciente de fármacos vasoactivos (para la realización del estudio, en caso de consumo, debió pasar al menos un tiempo superior a 4 veces la vida media del fármaco).

## 5.2. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS

### 5.2.1 VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS

Se realizó una entrevista clínica tanto a los pacientes con migraña como a sujetos controles para el estudio de las variables epidemiológicas (edad y sexo).

#### Edad y sexo

Se incluyeron pacientes de ambos sexos y la edad se registró en años.

### 5.2.2. VARIABLES CLÍNICAS

Los datos clínicos se obtuvieron mediante una entrevista médica. Se incluyeron el tipo de migraña, la frecuencia de las crisis, la intensidad de la cefalea, la duración de las crisis, el tiempo de evolución de la enfermedad y presencia de alodinia.

#### Tipo de migraña

Los sujetos con migraña se clasificaron en dos grupos de acuerdo con los criterios establecidos por la IHS en su última revisión (2013) en pacientes con migraña episódica y migraña crónica.

#### Frecuencia de las crisis

Se determinó mediante el número de días de dolor que cada paciente presentaba al mes.

#### Intensidad de la cefalea

Se determinó mediante la escala visual analógica (EVA). Se consideró una crisis de intensidad fuerte a aquellas que recibían una puntuación  $> 8$  en la escala EVA.

#### Duración de las crisis de migraña

Se determinó la duración de las crisis en horas. Se establecieron 2 categorías para clasificar a las migrañas en función de su duración:

- Dolor presente durante  $< 24$  horas.
- Dolor presente durante  $> 24$  horas.

#### Tiempo de evolución de la migraña

Se determinó en años, desde el inicio de la clínica hasta la inclusión en el estudio. Para ello establecimos tres grupos:

- Tiempo de evolución  $< 1$  año.
- Tiempo de evolución entre 1 y 5 años.
- Tiempo de evolución  $> 5$  años.

### Presencia de otras cefaleas.

Se determinó la presencia de otras cefaleas primarias (cefalea tensional y cefalea punzante primaria).

### Presencia de alodinia

Se registró si los pacientes presentaban alodinia, considerando como tal a la presencia de dolor ocasionado por un estímulo normalmente no doloroso.

## 5.2.3. VARIABLES ULTRASONOGRÁFICAS

Se realizó un estudio ultrasonográfico a todos los pacientes (casos y controles) para realizar la determinación de la vasodilatación dependiente de endotelio (VDE) en períodos asintomáticos. Para ello se empleó un ecodoppler color de alta definición Aplio 70 con un transductor de 7'5 Hz.

### Técnica de la vasodilatación dependiente de endotelio.

Se empleó el dúplex (ecografía en modo B de forma conjunta con el sistema de Doppler pulsado) en modo *dynamic flow*, técnica que permite un estudio de flujo interior de la arteria con una mayor definición. Se realizó la exploración en una sala tranquila, con temperatura estable controlada, por la mañana. Se recomendaba a los pacientes que estuvieran en ayunas de más de 8 horas, incluyendo cafeína y tabaco.

El paciente se colocaba en decúbito supino (relajado y manteniendo esta posición al menos 10 minutos antes de empezar)

con el brazo dominante extendido. Se localizaba la arteria braquial en un corte longitudinal justo por encima de la fosa antecubital (unos 5-10 cm por encima del pliegue del codo). Una vez obtenida la imagen arterial con una visualización óptima, se marcaba la posición del transductor y se medía el diámetro basal (d1) de la arteria braquial (media de 5 determinaciones), considerando siempre la interfaz entre la luz del vaso y el inicio de la pared vascular en ecografía modo B y siempre al final de la diástole del ciclo cardíaco. Posteriormente se insuflaba el manguito de presión arterial en el tercio proximal del antebrazo hasta alcanzar una presión de 300 mmHg, manteniendo esta presión durante 5 minutos. A continuación se procedía a desinflar el manguito, provocando de esta forma una hiperemia reactiva. Se obtenían nuevas imágenes de la arteria braquial a los 60 segundos de retirar el manguito, en la localización marcada previamente y se calculaba de nuevo el valor medio de 5 determinaciones del diámetro de la arteria postoclusión (d2).

La VDE se expresa como el porcentaje de variación entre el diámetro postoclusión frente al basal, según la fórmula  $DVE = \frac{d2-d1}{d1} \times 100$ .

#### **5.2.4. VARIABLES MOLECULARES**

En este estudio se han determinado varios marcadores moleculares implicados en distintos mecanismos fisiopatológicos de la migraña:

- Marcadores de inflamación sistémica: IL-6, IL-10, PCR y TNF alfa.
- Marcadores de inflamación neurogénica: CGRP.

- Marcadores de disfunción endotelial: PTX-3 y sTWEAK.
- Marcadores de disrupción de BHE: cFn.
- Marcadores de daño neuronal: S100 y ENE.

Se realizaron extracciones sanguíneas a todos los sujetos con migraña en períodos intercrisis y a todos los sujetos controles. La muestra de sangre se obtuvo de la vena cubital del brazo no dominante (el contrario al empleado durante el estudio ultrasonográfico), previamente a la aplicación de la isquemia para determinar la VDE.

El análisis molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Neurociencias Clínicas (LINC) por parte de biólogos ciegos para los parámetros clínicos y radiológicos del estudio.

Cada extracción sanguínea contenía 4.5 ml de sangre que se recogía en un tubo de bioquímica con separador para la obtención de suero. Los tubos se dejaban en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente para la formación del botón tisular y después se centrifugaban a 3000 rpm durante otros 15 minutos. El suero se repartía en 2 alícuotas de 1 ml y se congelaba a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los test moleculares oportunos.

Se llevaron a cabo las siguientes determinaciones moleculares:

- Los niveles de CGRP se determinaron mediante kits comercializados de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), obtenidos de Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA.

- Los niveles de IL-6, IL-10, TNF-alfa y PCR fueron determinados mediante sistemas de inmunodiagnóstico comercializados IMMULITE 1000 System, Siemens Healthcare Global, Los Angeles, CA, USA.

- Los niveles de sTWEAK y PTX3 se determinaron mediante kits comercializados de ELISA obtenidos de Assay Biotech, Sunnyvale, CA, USA.

- Los niveles de S100 fueron determinados mediante kits comercializados de ELISA obtenidos de Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Nordhom, Germany.

- Los niveles de cFn se determinaron mediante kits comercializados de ELISA obtenidos de Cusabio Life Science, Wuhan, China.

Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron  $< 8\%$  para todos los marcadores analizados.

#### 5.2.5. VARIABLES DE NEUROIMAGEN

Se realizó una RM encefálica en un equipo Philips Achieva de 3 Teslas a todos los pacientes con migraña y a los sujetos control. El protocolo de estudio incluyó secuencias T1, T2, T2\* y FLAIR.

En cada estudio se evaluó presencia de hiperseñales de sustancia blanca, hipointensidades en ganglios basales y tronco cerebral y lesiones isquémicas silentes. Todos los estudios de neuroimagen han sido evaluados por un neurorradiólogo del Servicio de Radiología del CHUS y biofísico especializado en neuroimagen, ciegos para las variables clínicas y de laboratorio.

### 5.2.5.1. Hiperseñales de sustancia blanca

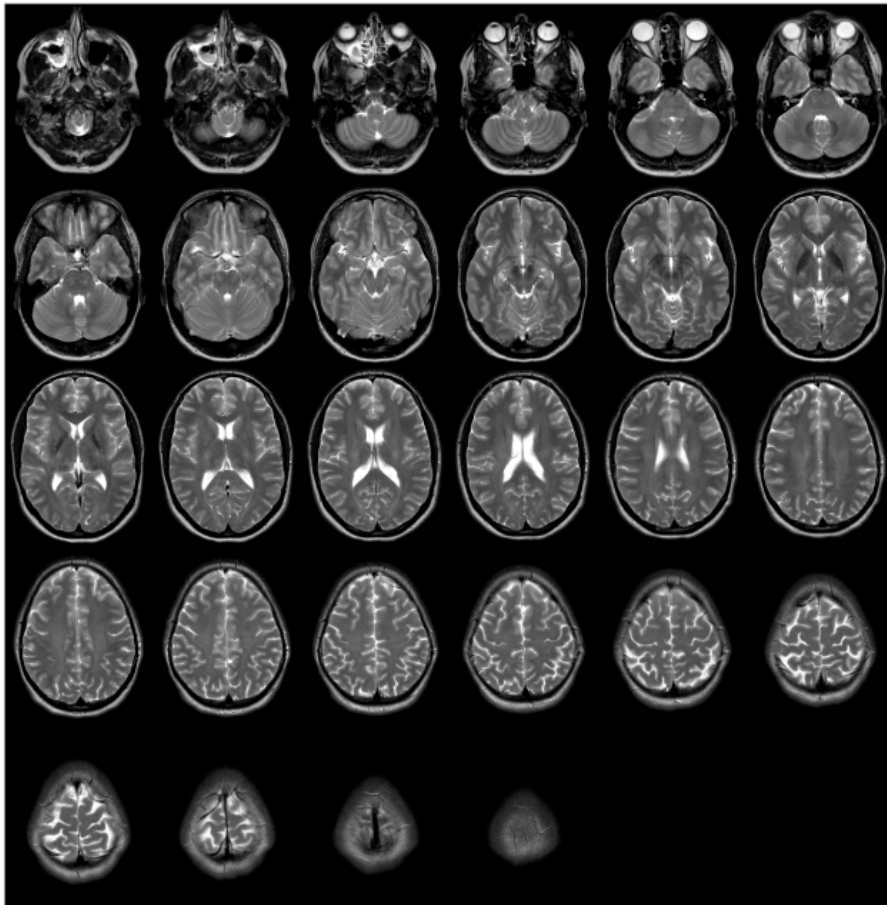
Se contabilizó de forma manual el número de hiperseñales en todas las secuencias de RM encefálica, tanto a nivel supra como infratentorial, siempre por el mismo observador. Se establecieron 3 categorías: menos de 3 hiperseñales, de 4 a 6 hiperseñales y más de 6 hiperseñales.

Asimismo se registró la localización de las hiperseñales: subcortical (SBS), periventricular (PV) y otras localizaciones (O).

### 5.2.5.2. Hipointensidades en ganglios de la base y tronco cerebral: depósitos de hierro

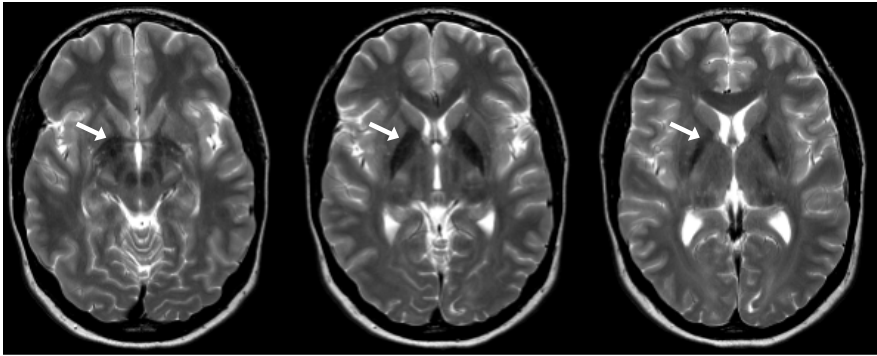
Las imágenes fueron adquiridas usando una secuencia TSE (Turbo Spin Echo) ponderada en T2, con un tren de 15 ecos y un tiempo de eco efectivo de  $T_{eff} = 120$  ms. El tiempo de repetición fue de  $TR = 3000$  ms (pulso de  $90^\circ$ ), y se adquirieron dos acumulaciones ( $N_{av} = 2$ ).

El cerebro de los sujetos se cubrió por completo en 28 cortes axiales de 4 mm de grosor con una separación de 5 mm entre sus centros ( $gap = 1$  mm) cubriendo un campo de visión de  $230 \times 230$  mm<sup>2</sup> con una matriz de  $576 \times 576$  puntos, resultando en una resolución en el plano de  $0.4 \times 0.4$  mm<sup>2</sup>. En la figura 14 mostramos un ejemplo de las imágenes de RM obtenidas en cada sujeto del estudio.



**Figura 14.** Imágenes de RM mostrando los 28 cortes axiales, adquiridos en secuencia T2, que cubren todo el cerebro.

Las hipointensidades localizadas en los ganglios de la base y núcleo rojo, causadas por la acumulación de hierro se observan con más detalle en la figura 15.



**Figura 15.** Tres cortes axiales consecutivos, que cubren un espesor total de 15 mm, y muestran los ganglios de la base. Las zonas donde se acumula el hierro (señal hipointensa en T2) están marcadas con flechas blancas.

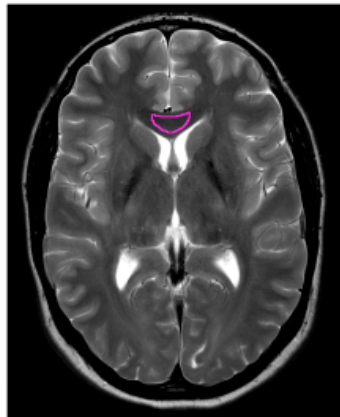
Para analizar las imágenes se siguió un procedimiento similar al descrito por Jurgens et al.<sup>299</sup> con ciertas modificaciones, tal y como se detalla a continuación. El procesado y análisis de las imágenes de RM se llevó a cabo usando la plataforma de imagen en Java Image-J (Rasband W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

### ***Paso 1: Normalización de las imágenes***

Todas las imágenes fueron normalizadas a la misma escala de grises, para poder compararlas entre sí, usando como referencia una zona claramente correspondiente a sustancia blanca. Para ello, primero se seleccionó un corte en el que fuera claramente visible el cuerpo calloso y se seleccionó manualmente una ROI (*region of interest*) en la zona central del mismo, típicamente 500-600 píxeles (figura 16).

Se midió el valor medio de la señal en esa ROI (97.1 en la imagen de muestra) y se calculó un factor de corrección para la imagen según la

fórmula:  $FC = (100/\text{Señal media ROI})$ . En el caso ejemplo mostrado en la figura 3 el factor resultó ser  $FC = 100/97.1 = 1.0299$ .



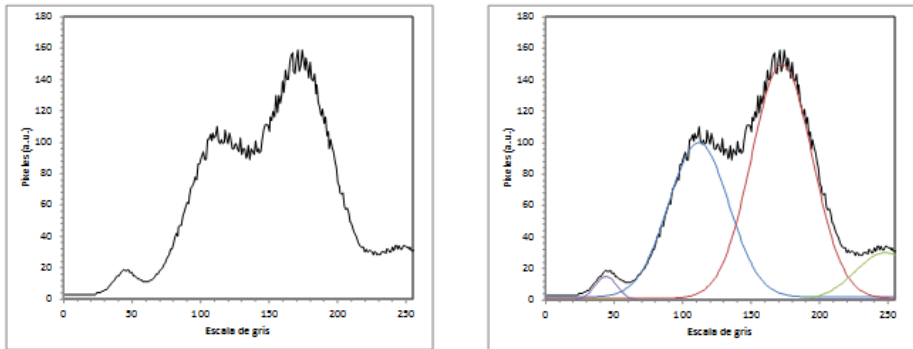
**Figura 16.** La zona magenta corresponde a la región del cuerpo calloso seleccionada para normalizar todas las imágenes a la misma escala de grises.

A continuación se multiplicó el set de 28 cortes axiales por este factor de corrección. Este proceso se realizó en cada uno de los sujetos estudiados, calculando en cada caso un factor de corrección. Los factores de corrección calculados oscilaron entre 0.4318 y 1.6556, con un valor medio de 0.9178. Finalmente se ajustó la escala de grises de las imágenes a un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 255 y las imágenes fueron transformadas a 8-bit.

### ***Paso 2: Segmentación de tejidos***

Un paso clave en nuestro estudio fue la segmentación de tejidos en 4 tipos diferentes: sustancia blanca, sustancia gris, líquido cefalorraquídeo y zonas de marcada hipointensidad, asimiladas con zonas de acumulación de hierro. Para ello se tomaron el total de las

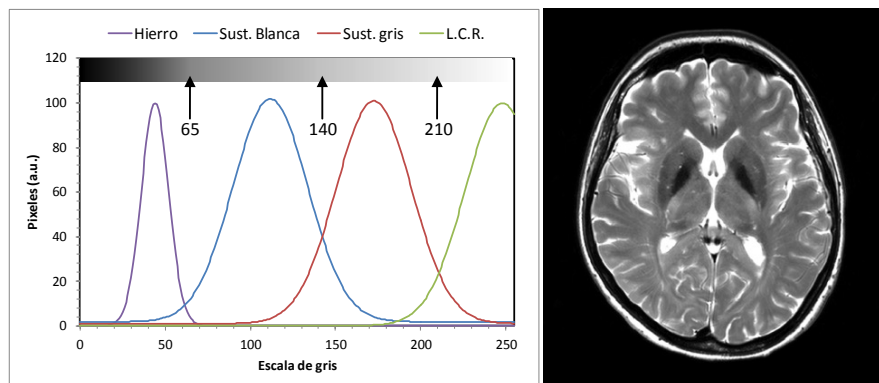
imágenes (28 cortes x 110 sujetos) y se construyó un histograma con los valores de escala de grises de todos los píxeles, tal y como se ve en la figura de la izquierda. En este histograma se identificaron 4 poblaciones diferentes de píxeles que se ajustaron a distribuciones gaussianas (figura 17).



**Figura 17.** A la izquierda, histograma mostrando la distribución de valores de escala de grises de las imágenes T2 adquiridas. A la derecha, ajuste de la gráfica a 4 campanas de Gauss (cuatro tipos de píxeles).

Tras normalizar las curvas gaussianas, se asignaron las cuatro poblaciones de píxeles y se establecieron los puntos utilizados para segmentar las 4 estructuras cerebrales deseadas (figura 18). Se consideró que todos aquellos píxeles cuyo valor de escala de grises es superior a 210 corresponden a líquido cefalorraquídeo, aquellos con valores comprendidos entre 65 y 140 corresponden a sustancia blanca o sustancia gris (el límite entre estas dos es normalmente difuso) y todos aquellos píxeles con un valor en escala de grises normalizada inferior a 65 correspondían a zonas claramente hipointensas, que o bien correspondían a vasos sanguíneos (aparecen oscuros por la hemoglobina, que contiene hierro, aunque este efecto es mucho más

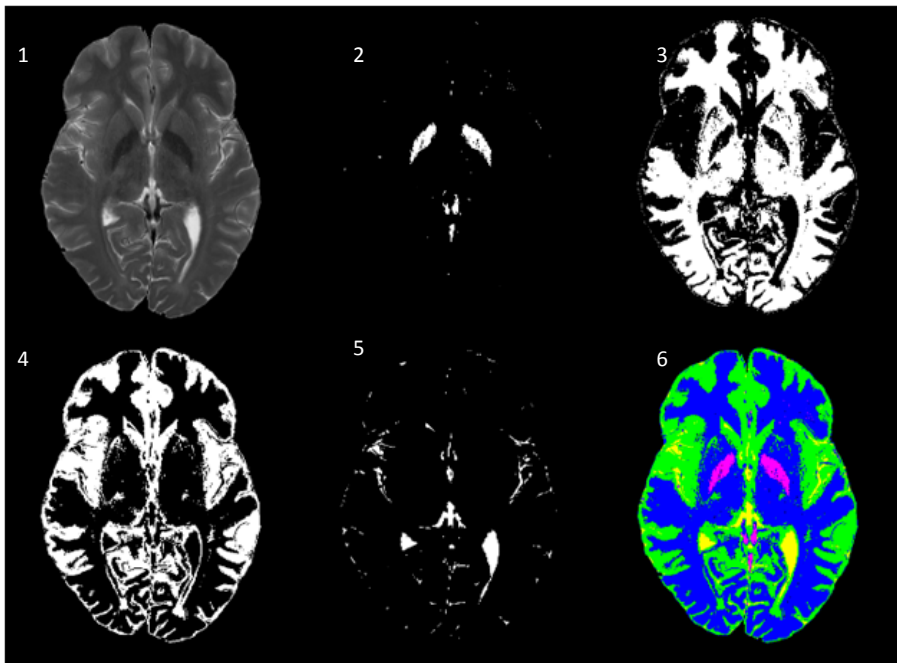
visible en imágenes T2\* que en imágenes T2) o a zonas de acumulación de hierro, cuando se trata de los núcleos de la base.



**Figura 18.** Asignación de píxeles a cada uno de los siguientes tipos: zonas hipointensas (píxeles con valor inferior a 65), sustancia blanca (entre 65 y 140), sustancia gris (entre 140 y 210) y LCR (píxeles con valor superior a 210). Las curvas de distribución de sustancia gris y blanca presentan un solapamiento importante, haciendo difícil definir un valor umbral claro para su separación.

De esta manera se segmentaron los tejidos cerebrales obteniéndose imágenes como las que se muestran en la figura 19.

Posteriormente se procesaron las imágenes de todos los pacientes, utilizando para el análisis ulterior las imágenes segmentadas de las zonas hipointensas (valor de escala de grises de pixel por debajo de 65) en los tres cortes consecutivos en los que se visualizan los núcleos de la base.



**Figura 19.** Imagen de RM de un cerebro ponderada en T2, junto con las máscaras construidas para LCR, sustancia gris, sustancia blanca y zonas hipointensas (por acumulación de hierro), acompañadas por una imagen coloreada que las muestra superpuestas. La separación de sustancia gris y blanca así como entre sustancia gris y LCR son difíciles de realizar, al solaparse la distribución normal de valores de escala de gris en las imágenes (histograma figura 15). No es el caso para la zona hipointensa (objetivo de este estudio) que se distingue bien del resto de tejidos.

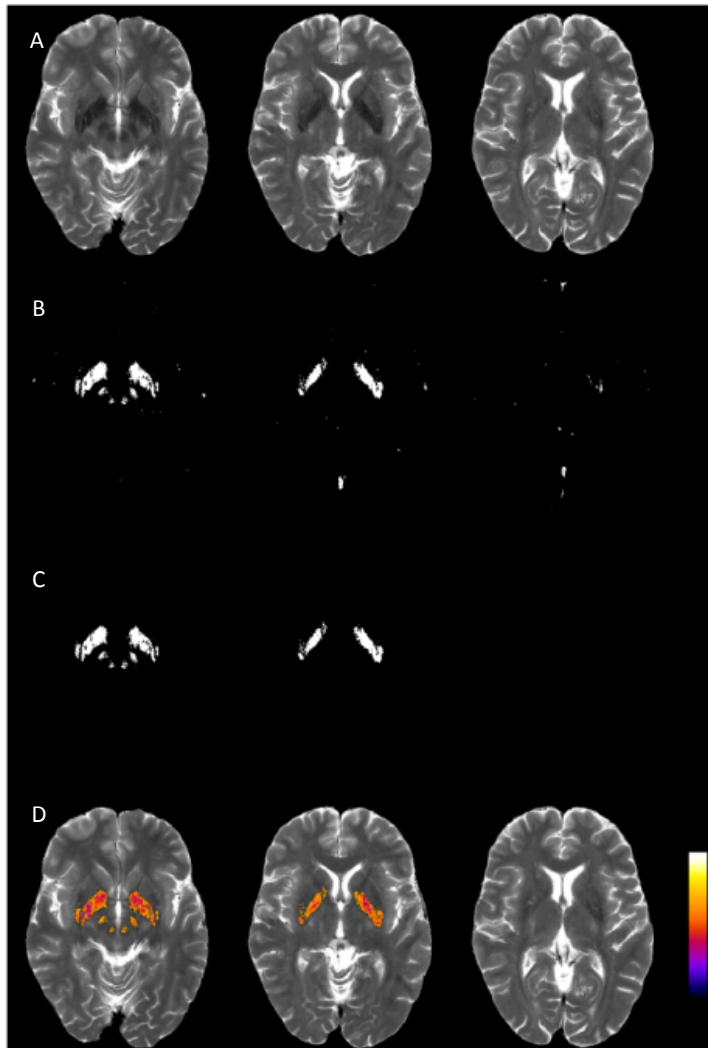
- 1: Imagen en escala de grises.
- 2: Hipointensidades (píxeles con valor de escala de gris menores a 65).
- 3: Sustancia blanca (píxeles con valor de escala de gris entre 65 y 140).
- 4: Sustancia gris (píxeles con valor de escala de gris entre 140 y 210).
- 5: Líquido cefalorraquídeo (píxeles con valor de escala de gris mayores de 210).
- 6: Imagen coloreada marcando todas las zonas segmentadas (verde = sustancia gris, azul = sustancia blanca, amarillo = LCR y magenta = hipo/isointensidades).

### ***Paso 3: Cuantificación de zonas hipointensas***

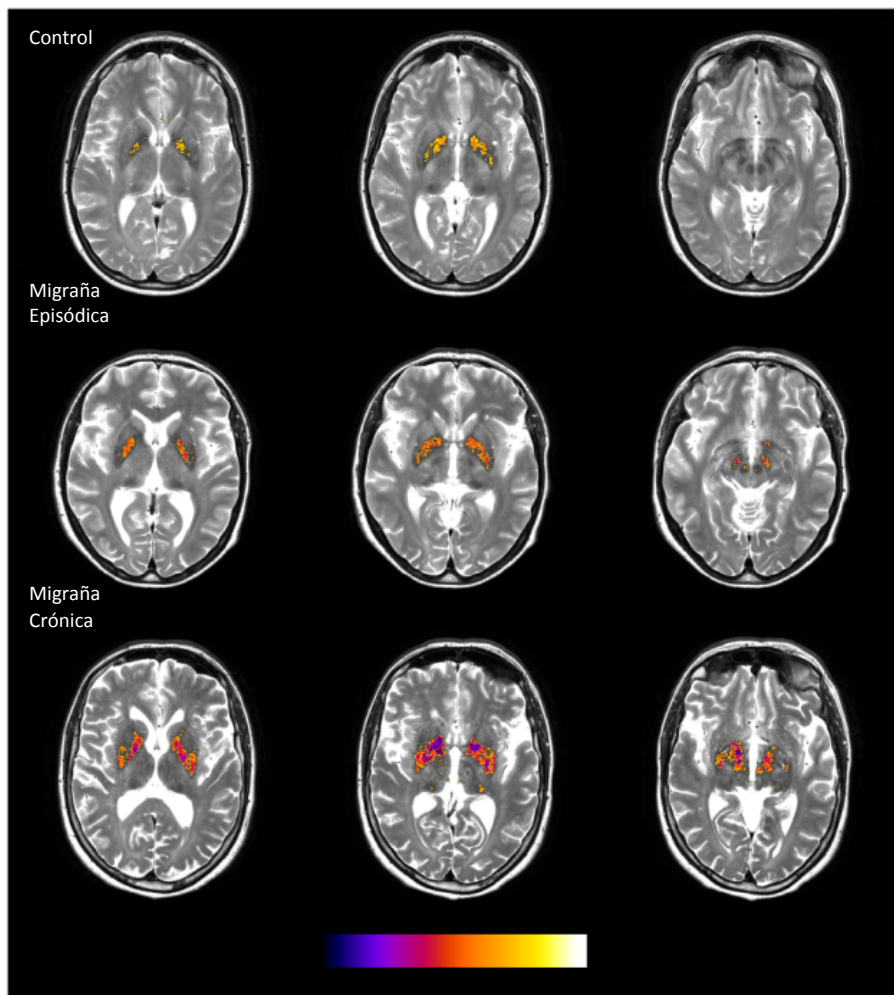
El último paso en el proceso de análisis de las imágenes se centró en la cuantificación de las zonas hipointensas en los ganglios basales. Para ello se seleccionaron 3 cortes consecutivos (grosor total de 15 mm) que incluían dicha zona, en cada uno de los pacientes, y se segmentaron como se ha descrito con anterioridad. A continuación se eliminaron manualmente píxeles que aparecen como hipointensos pero que no se localizan en los núcleos de la base (pequeños vasos, orificios, zonas donde la señal es suprimida por flujo, etc.), tal y como se muestra en la figura 20.

Una vez procesadas todas las imágenes se procedió a medir dos parámetros en cada una de ellas. En primer lugar se midió el área total (en mm<sup>2</sup>) de la zona considerada como hipointensa. A mayor extensión de tejido afectada por la acumulación de hierro, mayor valor de este parámetro se observó.

En segundo lugar se cuantificó el valor medio de la escala de grises en ese área concreta. En zonas donde se acumulaba poco hierro (zonas anaranjadas en la figura 21) el valor del píxel era inferior a 65, pero cercano a este valor. En las zonas donde se acumulaba más hierro, la hipointensidad era más marcada (zonas púrpura en figura 21) y el valor del píxel caía muy por debajo de 65. Así pues, valores medios más pequeños de intensidad indican una mayor acumulación de hierro que valores más altos de este parámetro.

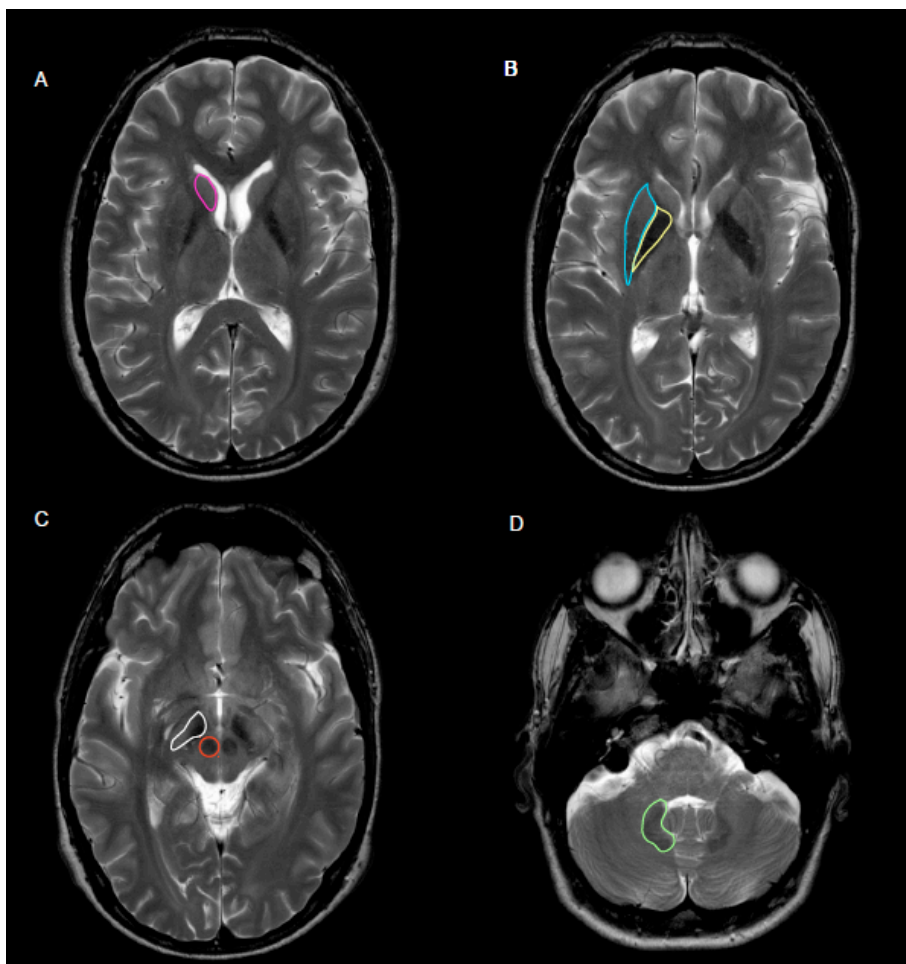


**Figura 20.** Representación gráfica de las hipointensidades en RM. **A:** En la parte superior se observan 3 cortes axiales consecutivos en los que se visualizan los ganglios basales. **B:** En estos cortes se eliminan todos los píxeles con valores de escala de gris superior a 65. **C:** Se eliminan manualmente los píxeles localizados fuera de los núcleos de la base. Estas hipointensidades son las que serán cuantificadas posteriormente. **D:** Imagen coloreada que muestra las zonas identificadas como hipointensas (pixel < 65) en los ganglios basales. Cuanto más hierro acumulado, más hipointenso (púrpura) es el píxel. En zonas con menos hierro, el píxel es menos hipointenso (anaranjado).



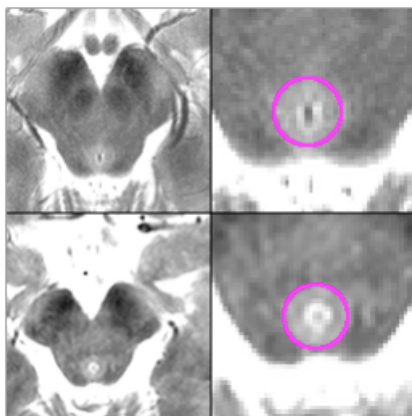
**Figura 21.** Imágenes mostrando zonas determinadas como hipointensas en los núcleos de la base de tres sujetos (control, migraña episódica y migraña crónica). La mayor acumulación de hierro se ve reflejada no solo en la presencia de zonas más amplias (mayor área), sino también más hipointensas (púrpura). Las zonas en tonalidad gris oscuro no satisfacen el criterio de intensidad inferior a 65, por lo que han sido consideradas tejido normal.

El análisis de hipointensidades se realizó en 6 regiones de interés (ROIs), por separado: globo pálido, núcleo rojo, sustancia negra, núcleo dentado, putamen, núcleo caudado (figura 22).



**Figura 22.** Regiones de interés analizadas en la RM. **A:** núcleo caudado (rosa), **B:** putamen (azul) y globo pálido (amarillo), **C:** núcleo rojo (naranja) y sustancia negra (blanco), **D:** núcleo dentado (verde).

Además del análisis de las hipointensidades a nivel de los ganglios basales realizamos un análisis específico de la sustancia gris periacueductal. En primer lugar se localizó una región de interés circular de 4 mm de radio comprendiendo la sustancia periacueductal, normalmente hiperintensa en imágenes T2 (figura 23).



**Figura 23.** Imagen de la sustancia periacueductal de un sujeto control (fila superior) y un sujeto migrañoso (fila inferior). En las imágenes de la derecha se ha delimitado el área analizada en un círculo magenta.

A continuación se realizó un proceso de análisis similar al aplicado para las otras regiones de interés (ganglios basales), pero no encontramos ningún pixel por debajo del umbral de 65, utilizado en el estudio anterior. Por este motivo, se procedió a medir el valor medio de la intensidad de señal en las ROIs circulares seleccionadas para cada uno de los sujetos, sin hacer ningún proceso de segmentación. Se midió el valor medio de la intensidad de señal y posteriormente se evaluó, ya que en este caso todas las áreas analizadas fueron las mismas (círculo de 4 mm de radio).

### 5.2.5.3. Lesiones isquémicas silentes

Asimismo se analizó la presencia de lesiones de tipo isquémico según la metodología utilizada por Palm-Meinders et al.<sup>247</sup>

Las lesiones isquémicas (LIS) se definen como defectos a nivel del parénquima cerebral, mayores de 2 mm, isointensos en todas las secuencias de RM. A nivel supratentorial están rodeados por un borde hiperintenso en secuencias FLAIR.

### 5.2.5.4. Otros análisis de neuroimagen

Se determinó para cada sujeto el volumen cerebral total, el volumen de sustancia blanca, el volumen de sustancia gris y el volumen de LCR.

## 5.3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Utilizando el EPIDAT 3.1 para el cálculo del tamaño muestral en grupos independientes (pacientes con migraña crónica y sujetos control) en relación a los marcadores moleculares, precisando 2 casos por cada control y esperando una diferencia de medias de 0.82 entre casos y controles de acuerdo a hallazgos de estudios previos, se necesitarían 36 casos y 18 controles para obtener un nivel de confianza del 95% (riesgo  $\alpha = 0.05$ ) y un poder estadístico del 80% (riesgo  $\beta = 0.20$ ).

Utilizando el EPIDAT 3.1 para el cálculo de tamaño muestral en grupos independientes (pacientes con migraña crónica y sujetos control) en relación a los marcadores ultrasonográficos, precisando 2

casos por cada control y esperando una diferencia de medias de 0.71 entre casos y controles, de acuerdo a los hallazgos de estudios previos, se necesitarían 46 casos y 23 controles para obtener un nivel de confianza del 95% (riesgo  $\alpha = 0.05$ ) y un poder estadístico del 80% (riesgo  $\beta = 0.20$ ).

#### 5.4. MÉTODO ESTADÍSTICO

La descripción de variables continuas se realizó mediante media y desviación estándar, si la distribución era normal o con la mediana y rango de percentiles en caso contrario.

Se utilizó el test de chi-cuadrado para el análisis de las variables cualitativas y el test ANOVA en el caso de las variables cualitativas de más de 2 grupos.

El test de Kolmogorov se empleó para determinar la normalidad de las variables cuantitativas y el test de la t de Student o de Mann-Whitney-Wilcoxon para determinar las diferencias de variables cuantitativas según su distribución.

Para la correlación entre dos variables del mismo grupo utilizamos rectas de correlación con intervalos de confianza del 95% y el coeficiente de Pearson para variables continuas (tiempo de evolución) o el coeficiente de Spearman para variables discontinuas (intensidad y frecuencia de las crisis).

El análisis de curva COR fue utilizado para establecer el punto de corte más apropiado para el volumen de hipointensidad (microL) que identifique a pacientes con diagnóstico clínico de migraña crónica.

Se consideró que un resultado era significativo para los valores de  $p < 0,05$ .

El análisis estadístico fue realizado con el software SPSS para Mac.





## 6. RESULTADOS





## 6. 1 ESTUDIO DESCRIPTIVO

### 6.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Estudio prospectivo realizado entre enero de 2013 y octubre de 2014 en la Unidad de Cefaleas del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Se han incluido en el estudio 112 pacientes diagnosticados de migraña, 57 con migraña episódica y 55 con migraña crónica, todos ellos evaluados durante el período interictal. Asimismo se incluyeron 25 controles sanos.

La edad media de los pacientes con migraña episódica fue de  $35.1 \pm 11.7$  años, y de  $44.4 \pm 11.1$  años en el grupo de migraña crónica. El 98.2% de los pacientes con migraña episódica eran mujeres y el 89.5% en el caso de la migraña crónica.

En el grupo control, la edad media fue de  $36.1 \pm 7.9$  años y el 92% eran mujeres ( $n = 23$ ). No encontramos diferencias significativas en cuanto a la edad y el sexo entre el grupo control y los pacientes con migraña episódica y crónica.

### 6.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

#### Frecuencia de las crisis

En relación al número de días con cefalea, los pacientes con migraña episódica presentaban  $3.9 \pm 2.7$  días/mes y los pacientes con migraña crónica  $17.4 \pm 6.1$  días/mes ( $p < 0.0001$ ).

### Intensidad de las crisis

En relación a la intensidad de las crisis observamos que la media de puntuación en la escala EVA era de 8 [7,9] en el grupo de migraña episódica y de 9 [8,10] en el grupo de migraña crónica ( $p = 0.011$ )

Al analizar el porcentaje de pacientes que refería una intensidad grave de las crisis (puntuación en la escala EVA  $\geq 8$ ) objetivamos un 69.9% en el grupo de pacientes con migraña episódica y un 81.8% en el grupo de migraña crónica ( $p < 0.0001$ ).

### Duración de las crisis

En cuanto a la duración de las crisis, la media era de  $28.9 \pm 37.5$  horas en el grupo de migraña episódica y de  $32.2 \pm 39.2$  en el grupo de migraña crónica ( $p = 0.647$ ). El 33.9% de los pacientes con migraña episódica presentaban crisis de más de 24 horas de duración vs. 30.9% en el caso de migraña crónica ( $p < 0.0001$ ).

### Tiempo de evolución

El tiempo medio de evolución de las migrañas era de  $12.2 \pm 11.3$  años para los pacientes con migraña episódica y de  $20.3 \pm 12.9$  años para los pacientes con migraña crónica ( $p = 0.001$ ).

### Presencia de otras cefaleas

El 42.1% de los pacientes con migraña episódica presentaban cefalea tensional y el 61.8% en el caso de los pacientes con migraña crónica.

## Alodinia

El 47.3% de los pacientes con migraña crónica presentaban alodinia y el 15.8% en el caso de la migraña episódica.

## 6.2. ESTUDIO ANALÍTICO

### 6.2.1. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES MOLECULARES Y VASODILATACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO

Realizamos un estudio comparativo entre los pacientes con migraña crónica, migraña episódica y sujetos control, tanto para los biomarcadores moleculares como para los valores neurosonológicos (VDE).

Al comparar los resultados obtenidos para los marcadores moleculares (media  $\pm$  desviación estándar) entre los distintos grupos observamos diferencias estadísticamente significativas en todos ellos, excepto para PCR y TNF-alfa (tabla 10).

Los pacientes con migraña crónica presentaban, con respecto a los pacientes con migraña episódica y controles, niveles elevados de las siguientes moléculas: marcadores de inflamación sistémica: IL-6 ( $10.1 \pm 1.9$  vs.  $7.7 \pm 2.3$  vs.  $3.6 \pm 0.7$ ,  $p < 0.0001$ ), marcadores de inflamación neurogénica: CGRP ( $268.5 \pm 87.4$  vs.  $202.7 \pm 78.4$  vs.  $124.5 \pm 7.4$ ,  $p < 0.0001$ ), marcadores de disfunción endotelial: PTX3 ( $1711.9 \pm 510.4$  vs.  $1328.9 \pm 458.9$  vs.  $486.3 \pm 286.9$ ,  $p < 0.0001$ ) y sTWEAK ( $171.8 \pm 147.7$  vs.  $272.8 \pm 146.2$  vs.  $23.5 \pm 11.1$ ,  $p < 0.0001$ ), marcadores de disrupción de BHE: cFn ( $20.4 \pm 6.0$  vs.  $12.9 \pm 3.7$  vs.  $8.0 \pm 1.2$ ,  $p < 0.0001$ ) y marcadores de daño cerebral: S100 ( $0.17 \pm 0.08$  vs.  $0.07 \pm$

0.02 vs.  $0.06 \pm 0.01$ ,  $p < 0.0001$ ) y ENE ( $21.7 \pm 3.2$  vs.  $13.1 \pm 2.8$  vs.  $15.1 \pm 2.5$ ,  $p < 0.0001$ ). Los niveles de IL-10, marcador de inflamación sistémica, eran menores en los pacientes con migraña crónica con respecto a migraña episódica y controles ( $1.3 \pm 0.4$  vs.  $1.2 \pm 0.5$  vs.  $2.7 \pm 1.1$ ,  $p < 0.001$ ), figuras 24 y 25.

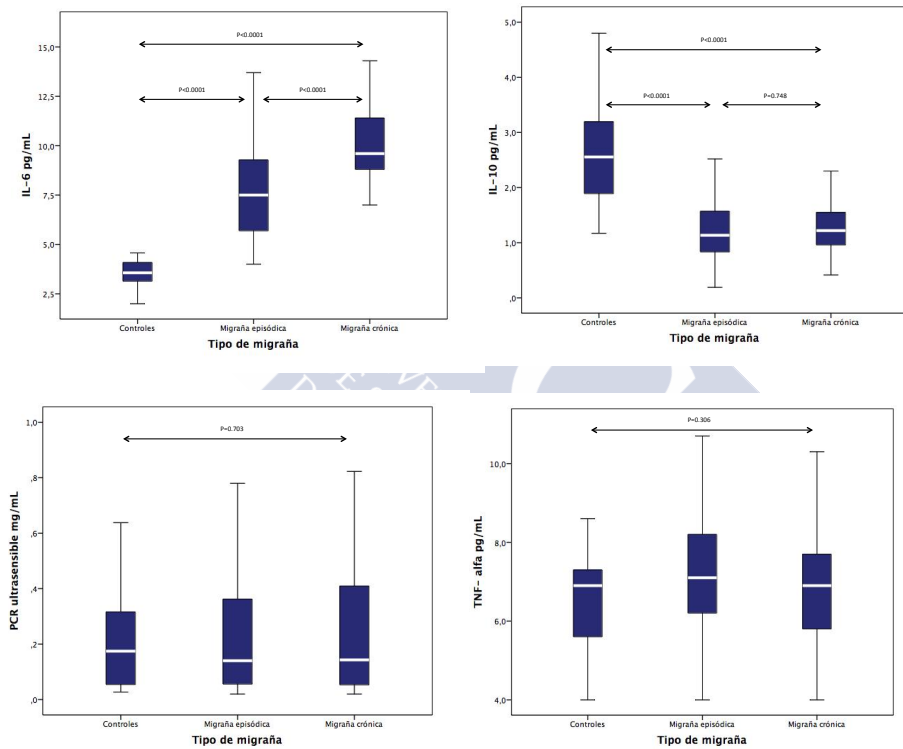
Marcador	Controles (n= 25)	p*	Migraña episódica (n =57)	p*	Migraña crónica (n =55)	p**
<b>MARCADORES DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA</b>						
IL-6 (pg/mL)	$3.6 \pm 0.7$	< 0.0001	$7.7 \pm 2.3$	< 0.0001	$10.1 \pm 1.9$	< 0.0001
IL-10 (pg/mL)	$2.7 \pm 1.1$	< 0.0001	$1.2 \pm 0.5$	0.748	$1.3 \pm 0.4$	< 0.0001
PCRus (mg/mL)	$0.2 \pm 0.2$		$0.2 \pm 0.2$		$0.3 \pm 0.2$	0.703
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	$6.6 \pm 1.4$		$7.1 \pm 1.5$		$6.8 \pm 1.5$	0.306
<b>MARCADORES DE INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA</b>						
CGRP (ng/mL)	$124.5 \pm 7.4$	< 0.0001	$202.7 \pm 78.4$	< 0.0001	$268.5 \pm 87.4$	< 0.0001
<b>MARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL</b>						
VDE (%)	$32.6 \pm 7.1$	< 0.0001	$19.3 \pm 14.1$	< 0.0001	$10.3 \pm 7.3$	< 0.0001
PTX3 (pg/mL)	$486.3 \pm 286.9$	< 0.0001	$1328.9 \pm 458.9$	< 0.0001	$1711.9 \pm 510.4$	< 0.0001
sTWEAK (pg/mL)	$23.5 \pm 11.1$	< 0.0001	$272.8 \pm 146.2$	< 0.0001	$171.8 \pm 147.7$	< 0.0001
<b>MARCADORES DE DISRUPCIÓN DE LA BHE</b>						
cFn ( $\mu$ g/mL)	$8.0 \pm 1.2$	< 0.0001	$12.9 \pm 3.7$	< 0.0001	$20.4 \pm 6.0$	< 0.0001
<b>MARCADORES DE DAÑO CEREBRAL</b>						
S100 ( $\mu$ g/mL)	$0.06 \pm 0.01$	0.101	$0.07 \pm 0.02$	< 0.0001	$0.17 \pm 0.08$	< 0.0001
ENE (ng/mL)	$15.1 \pm 2.5$	0.09	$13.1 \pm 2.8$	< 0.0001	$21.7 \pm 3.2$	< 0.0001

\* t de Student entre dos variables; \*\* ANOVA test entre las tres variables

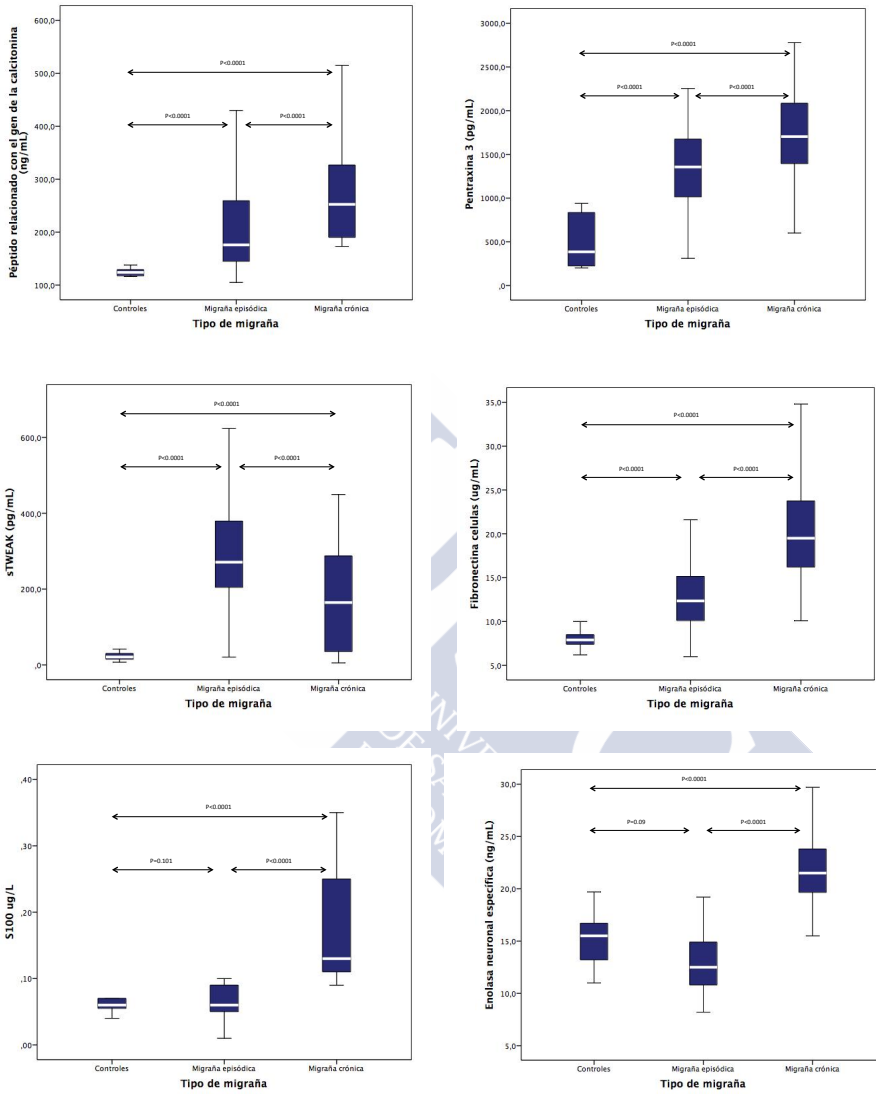
**Tabla 10.** Estudio estadístico de marcadores de inflamación sistémica y neurogénica, de disfunción endotelial, de disrupción de BHE y daño cerebral en controles, migraña episódica y migraña crónica.

Los pacientes con migraña crónica presentaban además un menor grado de VDE con respecto al grupo migraña episódica y control ( $10.3 \pm 7.3 \%$  vs.  $19.3 \pm 14.1 \%$  vs.  $32.6 \pm 7.1 \%$ ,  $p < 0.0001$ ), figura 26.

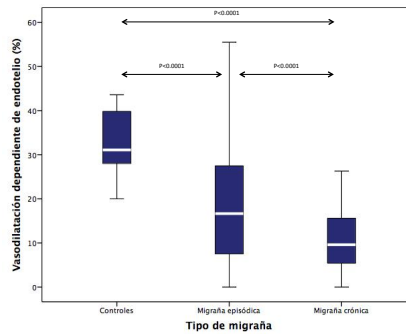
No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PCR y TNF-alfa entre los pacientes con migraña crónica, migraña episódica y controles.



**Figura 24:** Relación entre los niveles de IL-6, IL-10, PCR, y TNF-alfa en controles, migraña episódica y migraña crónica.



**Figura 25:** Relación entre los niveles de CGRP, PTX3, sTWEAK, cFn, S100 y ENE en controles, migraña episódica y migraña crónica.



**Figura 26:** Relación entre los niveles de VDE en controles, migraña episódica y migraña crónica.

## 6.2.2. ANÁLISIS DEL ESTUDIO DE NEUROIMAGEN

Se realizó estudio de RM encefálica 3T a 112 pacientes con migraña (57 migrañas episódicas y 55 migrañas crónicas) y a 21 controles.

### 6.2.2.1. Hiperseñales de sustancia blanca

Los pacientes con migraña crónica presentaban más hiperseñales (60%) que los pacientes con migraña episódica (19.3%) y que los controles (14.3%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

#### Número de hiperseñales en sustancia blanca

Se establecieron 3 categorías para evaluar el número de hiperseñales en cada grupo de estudio (menos de 3 hiperseñales, entre 4 y 6 hiperseñales y más de 6 hiperseñales).

Los pacientes con migraña crónica presentaban más hiperseñales que los pacientes con migraña episódica y los sujetos control.

Obsevamos más de 6 hiperseñales en el 38.2% de los pacientes con migraña crónica y en el 8.8% de las migrañas episódicas. Ningún sujeto control presentaba más de 6 hiperseñales. Encontramos entre 4 y 6 lesiones en el 21.8% de los pacientes con migraña crónica, en el 14% de los pacientes con migraña episódica y en el 4.3% de los controles y menos de 3 lesiones en el 1.8% de los pacientes con migraña episódica y el 8.7% de controles (tabla 11).

	Controles (n =21)	Migraña episódica (n =57)	Migraña crónica (n = 55)	p
<b>Hiperseñales (%)</b>	14.3	19.3	60	<0.0001
<b>Nº de hiperseñales (%)</b>				<0.0001
• 0	87	75.4	40	
• 1-3	8.7	1.8	0	
• 4-6	4.3	14	21.8	
• >6	0	8.8	38.2	
<b>Localización de las hiperseñales (%)</b>				<0.0001
• SBS	13	7	9.1	
• SBS+PV	0	12.3	41.8	
• SBS+0	0	5.3	9.3	

**Tabla 11.** Porcentaje de pacientes con hiperseñales, número de hiperseñales y localización de las hiperseñales en el grupo control, migraña episódica y migraña crónica.

### Localización de las hiperseñales de sustancia blanca

La localización más frecuente de las hiperseñales en los pacientes con migraña crónica era a nivel subcortical y periventricular (41.8% de los pacientes con migraña crónica), seguido de la localización

subcortical y otras localizaciones (9.3%). En el caso de los pacientes con migraña episódica, el 12.3% presentaba hiperseñales a nivel subcortical y periventricular, el 7% a nivel subcortical y el 5.3% a nivel subcortical y otras localizaciones. En 13% de los sujetos control presentaba hiperseñales de sustancia blanca, todas ellas localizadas a nivel subcortical.

#### **6.2.2.2. Hipointensidades en RM: depósitos de hierro.**

Calculamos el volumen de las zonas hipointensas (microL) en los núcleos de la base y la sustancia gris periacueductal aplicando la metodología descrita previamente. Consideramos que las zonas más hipointensas (valor de escala de grises < 65) corresponden a zonas de depósito de hierro.

El análisis de las hipointensidades se realizó en 6 regiones de interés de los ganglios basales, por separado: núcleo dentado, núcleo rojo, sustancia negra, globo pálido, núcleo caudado y putamen. Además se analizaron las hipointensidades a nivel de la sustancia gris periacueductal.

No encontramos hipointensidades, según el criterio de definición de hipointensidad aplicado en nuestro estudio, en el núcleo caudado y en el putamen.

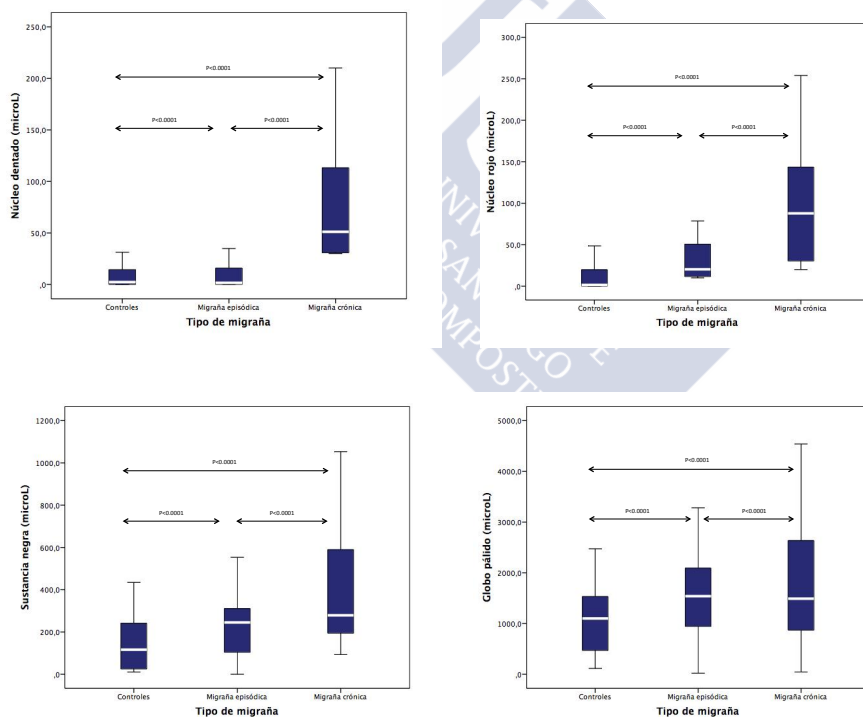
Los pacientes con migraña crónica presentaban hipointensidades de mayor volumen en el núcleo dentado, el núcleo rojo, la sustancia negra, el globo pálido y la sustancia gris periacueductal, comparado con los pacientes con migraña episódica y controles, con una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ), tabla 12, figuras 27 y 28.

Volumen de hipointensidad en RM (microL)	Controles	Migraña episódica	Migraña crónica	p <sup>*,**</sup>
<b>Núcleo dentado</b>	7.1 ± 10.5	8.8 ± 11.1	74.8 ± 50.8	< 0.0001
<b>Núcleo rojo</b>	9.9 ± 13.8	29.8 ± 21.9	91.9 ± 64.4	< 0.0001
<b>Sustancia negra</b>	153.4 ± 148.1	242.2 ± 144.1	388.7 ± 270.9	< 0.0001
<b>Globo pálido</b>	1112.9 ± 700.3	1585.8 ± 827.7	1758.7 ± 1133.8	< 0.0001
<b>Sustancia gris periacueductal</b>	167.5 ± 21.3	261.7 ± 13.5	359.3 ± 13.5	< 0.0001

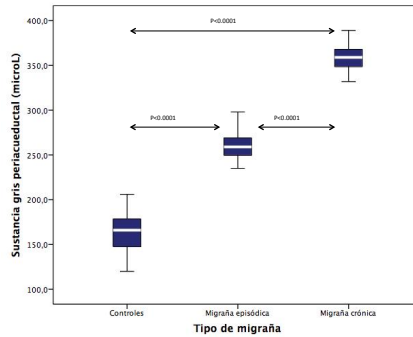
\* Test de ANOVA

\*\* Al comparar solo los grupos con migraña con el test de la t de Student, todos los valores con p < 0.0001, con excepción de la hipodensidad en el globo pálido, p = 0.281.

**Tabla 12.** Volumen de hipointensidad en cada región de interés en controles, pacientes con migraña episódica y migraña crónica.



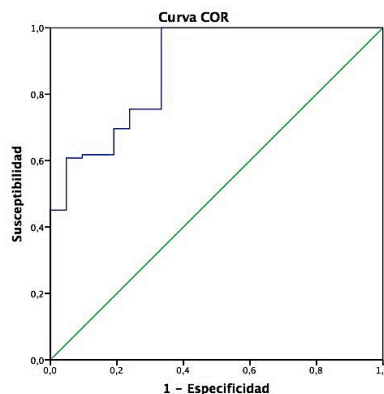
**Figura 27:** Relación entre el volumen de hipointensidad en el núcleo dentado, núcleo rojo, sustancia negra y globo pálido en controles, migraña episódica y migraña crónica.



**Figura 28:** Relación entre el volumen de hipointensidad la sustancia gris periacueductal en controles, migraña episódica y migraña crónica.

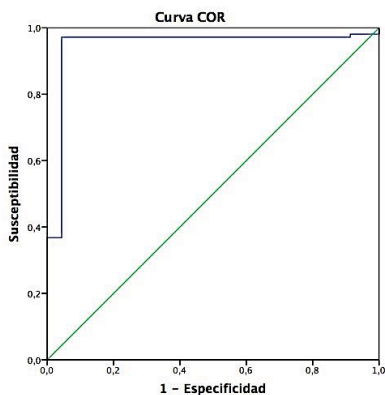
Se calcularon puntos de corte asociados al diagnóstico de migraña crónica, analizando el volumen de las hipointensidades de las estructuras que presentan una mayor diferencia entre casos y controles (núcleo rojo y sustancia gris periacueductal,  $p < 0.0001$ ).

El análisis de la curva COR (Característica Operativa del Receptor) muestra que una hipointensidad en el núcleo rojo de  $> 15$  microlL identifica pacientes con migraña crónica con una sensibilidad del 80% y con una especificidad del 71% (figura 29).



**Figura 29.** Curva COR del núcleo rojo. Área bajo la curva = 0.881 (IC 95% = 0.800 - 0.962),  $p < 0.0001$ .

El análisis de la curva COR muestra que una hipointensidad en la sustancia gris periacueductal > 240 microL identifica pacientes con migraña crónica con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 97% (figura 30).



**Figura 30.** Curva COR de la sustancia gris periacueductal. Área bajo la curva = 0.946. IC 95% = 0.887 - 1.000,  $p < 0.0001$ .

### 6.2.2.3. Lesiones isquémicas silentes

No observamos lesiones isquémicas silentes en los sujetos incluidos en el estudio.

### 6.2.2.4. Otros análisis

No hemos detectado diferencias en cuanto al volumen cerebral total, volumen de sustancia blanca, volumen de sustancia gris y volumen de LCR entre los sujetos con migraña y los controles.

### 6. 3. RELACIÓN ENTRE VARIABLES

#### 6.3.1. RELACIÓN ENTRE HIPERSEÑALES DE SUSTANCIA BLANCA Y VARIABLES CLÍNICAS

Observamos que cuanto mayor era el tiempo de evolución de la migraña, mayor era el porcentaje de pacientes con hiperseñales en sustancia blanca, siendo esta diferencia significativa.

Si clasificamos a los pacientes según el tiempo de evolución en tres grupos (< 1 año, entre 1 y 5 años, >5 años) encontramos que el 89.5% de los pacientes migraña crónica con un tiempo de evolución mayor de 5 años presentaban hiperseñales de sustancia blanca, el 75% de los pacientes con migraña crónica con un tiempo de evolución entre 1 y 5 años y en el 6.2% de pacientes con migraña crónica con una evolución menor de 1 año ( $p < 0.0001$ ). En el grupo migraña episódica, el 41.7% de los pacientes con un tiempo de evolución entre 1 y 5 años presentaban hiperseñales y el 14.7% de los pacientes con un tiempo de evolución menor a 1 año ( $p = 0.030$ ).

Los pacientes con un mayor número de hiperseñales presentaban un mayor tiempo de evolución de la migraña, tanto para migraña crónica como para migraña episódica (tablas 13 y 14).

En el grupo de migraña crónica, el 66.7% de los pacientes con más de 6 hiperseñales presentaban un tiempo de evolución mayor de 5 años, el 28.6% entre 1 y 5 años y el 4.5% menos de 1 año de evolución. La mayor parte de pacientes con migraña crónica sin hiperseñales de sustancia blanca (68.2%) presentaban menos de 1 año de evolución (tabla 13).

Nº de hiperseñales	< 1 año n = 16	1-5 años n = 20	> 5 años n = 19	p
0	68.2	22.7	9.1	<0.0001
1- 3	0	0	0	
4 - 6	0	75.0	25.0	
> 6	4.8	28.6	66.7	

**Tabla 13.** Relación entre el número de hiperseñales y tiempo de evolución (< 1 año, entre 1 y 5 años, > 5 años) en pacientes con migraña crónica.

Nº de hiperseñales	< 1 año n = 34	1-5 años n = 12	> 5 años n = 10	p
0	69.0	16.7	14.3	0.001
1- 3	0	100.0	0	
4 - 6	50.0	50.0	0	
> 6	20.0	0	80.0	

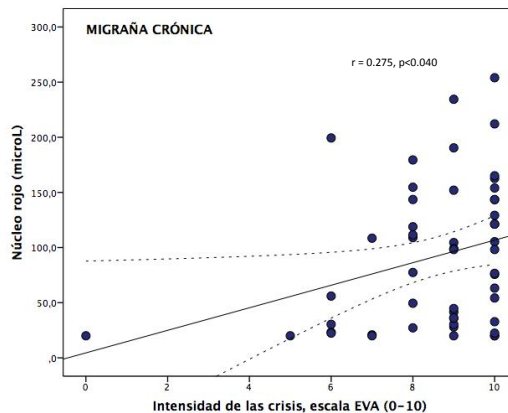
**Tabla 14.** Relación entre el número de hiperseñales y tiempo de evolución (< 1 año, entre 1 y 5 años, > 5 años) en pacientes con migraña episódica.

No encontramos diferencias significativas al comparar el porcentaje de pacientes con hiperseñales, o el número de hiperseñales, y otras variables clínicas (intensidad, frecuencia y duración de las crisis), tanto en el grupo de pacientes con migraña crónica como con migraña episódica.

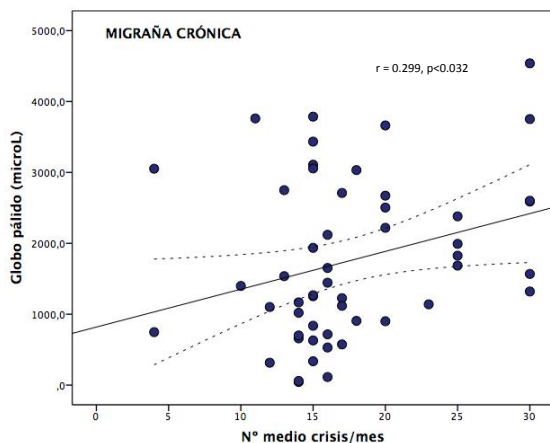
### 6.3.2. RELACIÓN ENTRE HIPOINTENSIDADES EN RM Y VARIABLES CLÍNICAS

Se estudió la relación entre las hipointensidades detectadas en RM y las variables clínicas (tiempo de evolución, intensidad, frecuencia y duración de las crisis) mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Observamos una correlación entre el volumen de hipointensidad en el núcleo rojo y la intensidad de las crisis en los pacientes con migraña crónica ( $r = 0.275$ ,  $p < 0.040$ , figura 31) y el volumen de hipointensidad en el globo pálido y la frecuencia de las crisis en los pacientes con migraña crónica ( $r = 0.299$ ,  $p < 0.032$ , figura 32).



**Figura 31.** Correlación entre el volumen de hipointensidad en el núcleo rojo y la intensidad de las crisis en pacientes con migraña crónica.



**Figura 32.** Correlación entre el volumen de hipointensidad en el globo pálido y la frecuencia de las crisis en pacientes con migraña crónica.

### 6.3.3. RELACIÓN ENTRE HIPERSEÑALES DE SUSTANCIA BLANCA, MARCADORES MOLECULARES Y NEUROSONOLÓGICOS

Los pacientes con migraña crónica e hiperseñales en la sustancia blanca presentaban niveles aumentados de IL-6, cFn y ENE con respecto a los pacientes con migraña crónica que no presentaban hiperseñales en sustancia blanca, con una diferencia significativa (tabla 15).

En cuanto a la VDE, observamos que los pacientes con migraña crónica e hiperseñales presentaban una reducción de los valores de la VDE de forma significativa ( $p=0.006$ ).

Marcador	Hiperseñales de sustancia blanca		p
	No	Sí	
IL-6 (pg/mL)	7.5 ± 2.8	9.2 ± 2.9	0.001
IL-10 (pg/mL)	1.6 ± 0.9	1.3 ± 0.4	0.158
PCRus (mg/mL)	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.295
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	6.8 ± 1.3	7.0 ± 1.7	0.512
CGRP (ng/mL)	215.5 ± 97.4	226.3 ± 82.4	0.413
VIP (ng/mL)	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.148
VDE (%)	19.6 ± 13.9	13.7 ± 10.1	0.006
PTX3 (pg/mL)	1305.1 ± 657.5	1480.9 ± 520.8	0.167
sTWEAK (pg/mL)	196.6 ± 158.4	185.8 ± 161.6	0.557
ET-3 (ng/mL)	10.9 ± 5.2	12.6 ± 4.3	0.063
cFn ( $\mu$ g/mL)	14.2 ± 6.5	17.4 ± 6.2	0.008
S100 ( $\mu$ g/mL)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.074
ENE (ng/mL)	15.9 ± 4.8	18.7 ± 5.1	0.002

Tabla 15. Marcadores moleculares y VDE en pacientes con migraña crónica y presencia/ausencia de hiperseñales de sustancia blanca.

#### 6.3.4. RELACIÓN ENTRE HIPOINTENSIDADES EN RM, MARCADORES MOLECULARES Y NEUROSONOLÓGICOS

Se estudió la relación entre el volumen de hipointensidad, los marcadores moleculares y la VDE en los pacientes con migraña crónica y migraña episódica mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

En los pacientes con migraña crónica existe una mayor correlación entre los marcadores de disrupción de BHE (cFn) y volumen de hipointensidad en núcleo dentado, núcleo rojo y sustancia gris periacueductal, y entre los marcadores de daño neuronal (S100 y ENE) y volumen de hipointensidad en núcleo dentado, núcleo rojo y sustancia gris periventricular (tabla 16).

	N. dentado		N. rojo		S. negra		G. pálido		S. gris periacued.	
	C.P	p	C.P	p	C.P.	p	C.P.	p	C.P.	p
IL-6	0.207	0.140	0.461	<0.001	0.136	0.335	0.185	0.190	0.405	<0.001
IL-10	-0.168	0.233	-0.025	0.863	-0.040	0.776	-0.080	0.573	-0.050	0.719
PCR <sub>us</sub>	0.080	0.574	0.337	0.015	0.095	0.502	0.156	0.268	0.093	0.500
TNF- $\alpha$	0.064	0.658	0.029	0.839	0.195	0.174	0.107	0.458	0.139	0.322
CGRP	0.119	0.401	0.203	0.148	0.149	0.291	0.255	0.068	0.357	0.001
VDE	-0.113	0.425	-0.114	0.421	-0.075	0.599	-0.025	0.863	-0.010	0.943
PTX3	0.085	0.549	0.162	0.252	0.046	0.754	0.161	0.253	0.354	0.005
sTWEAK	0.038	0.789	0.203	0.148	0.082	0.563	0.014	0.924	0.091	0.507
cFn	0.506	<0.001	0.681	<0.001	0.324	0.010	0.309	0.037	0.769	<0.001
S100	0.687	<0.001	0.454	<0.001	0.245	0.151	0.005	0.971	0.705	<0.001
ENE	0.506	<0.001	0.610	<0.001	0.462	<0.001	0.086	0.545	0.743	<0.001

\* C.P. = coeficiente de Pearson

**Tabla 16.** Correlación entre las hipointensidades en RM y los marcadores moleculares y neurosonológicos en pacientes con migraña crónica.

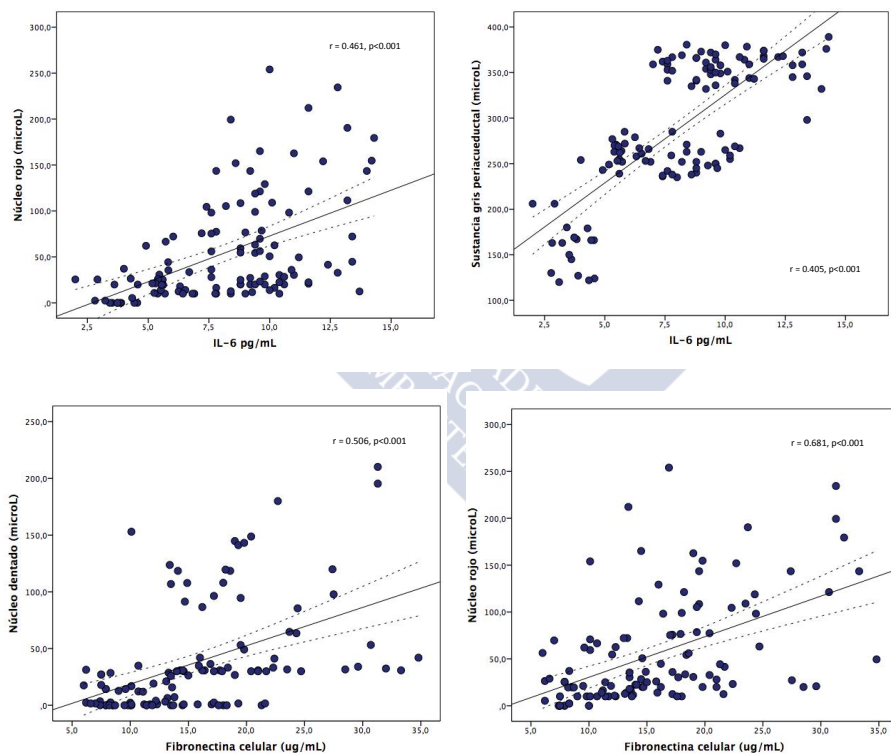
En los pacientes con migraña crónica detectamos como correlaciones más significativas (aquellas con un coeficiente de Pearson  $> 0.400$  y  $p < 0.00$ ) las siguientes:

Entre los marcadores de inflamación sistémica, los niveles de IL-6 tienen una correlación significativa con el volumen de hipointensidad en el núcleo rojo ( $r = 0.461$ ,  $p < 0.001$ ) y el volumen de hipointensidad en sustancia gris periacueductal ( $r = 0.405$ ,  $p < 0.001$ ), figura 33.

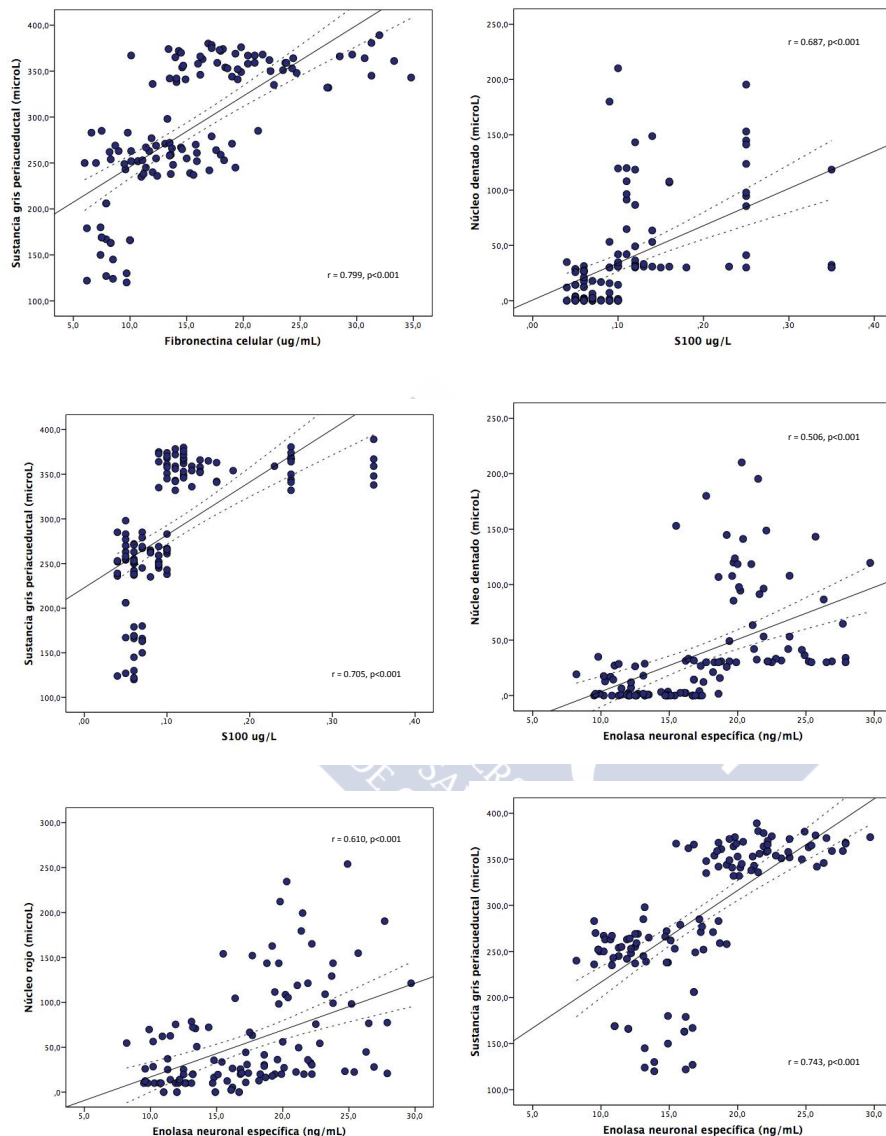
Los niveles de cFn, marcador de disrupción de BHE, tienen una correlación positiva con el volumen de hipointensidad en núcleo dentado ( $r = 0.506$ ,  $p < 0.001$ ), el volumen de hipointensidad en núcleo rojo ( $r = 0.681$ ,  $p < 0.001$ ) y volumen de hipointensidad en sustancia gris periacueductal ( $r = 0.769$ ,  $p < 0.001$ ), figuras 33 y 34.

Entre los marcadores de daño cerebral, los niveles de S100 tienen una correlación significativa con el volumen de hipointensidad en

núcleo dentado ( $r = 0.687, p < 0.001$ ), el volumen de hipointensidad en el núcleo rojo ( $r = 0.454, p < 0.001$ ) y volumen de hipointensidad en sustancia gris periacueductal ( $r = 0.705, p < 0.001$ ). Asimismo los niveles de ENE tienen también una correlación significativa con el volumen de hipointensidad en núcleo dentado ( $r = 0.506, p < 0.001$ ), el volumen de hipointensidad en núcleo rojo ( $r = 0.610, p < 0.001$ ), el volumen de hipointensidad en la sustancia negra ( $r = 0.462, p < 0.001$ ) y el volumen de hipointensidad en sustancia gris periacueductal ( $r = 0.743, p < 0.001$ ), figura 34.



**Figura 33.** Correlación entre el volumen de hipointensidad en el núcleo rojo y sustancia gris periacueductal y los niveles de IL-6 y entre el volumen de hipointensidad en núcleo dentado y núcleo rojo y los niveles de cFn en pacientes con migraña crónica.



**Figura 34.** Correlación entre el volumen de hipointensidad en la sustancia gris periacueductal y los niveles de cFn, volumen de hipointensidad en núcleo dentado y sustancia gris periacueductal y los niveles de S100, volumen de hipointensidad en el núcleo dentado, núcleo rojo y sustancia gris periacueductal y los niveles de ENE en pacientes con migraña crónica.

En los pacientes con migraña episódica existe muy buena correlación entre marcadores de inflamación (IL-6, CGRP) y volumen de hipointensidad en núcleo rojo y sustancia gris periacueductal, entre marcadores de disfunción endotelial (VDE y PTX3) y volumen de hipointensidad en sustancia gris periacueductal y marcadores de disfunción de BHE (cFn) y volumen de hipointensidad en sustancia gris periacueductal. Sin embargo, no existe correlación entre marcadores de daño neuronal (S100 y ENE) y volumen de hipointensidad en las zonas analizadas (tabla 17).

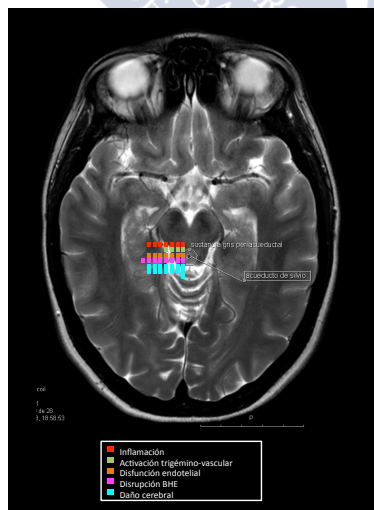
	N. dentado		N. rojo		S. negra		G. pálido		S. gris periac.	
	C.P	p	C.P	p	C.P.	p	C.P.	p	C.P.	p
IL-6	0.240	0.092	0.657	<0.001	0.194	0.229	0.286	0.031	0.884	<0.001
IL-10	-0.071	0.633	-0.014	0.927	-0.144	0.335	-0.071	0.633	-0.296	0.039
PCRus	0.055	0.711	0.003	0.982	0.087	0.555	0.210	0.151	0.006	0.967
TNF- $\alpha$	0.124	0.412	0.169	0.260	0.131	0.386	0.271	0.069	0.100	0.501
CGRP	0.495	<0.001	0.649	<0.001	0.188	0.196	0.167	0.250	0.554	<0.001
VDE	-0.329	0.041	-0.419	<0.001	-0.042	0.775	-0.172	0.236	-0.686	<0.001
PTX3	0.150	0.304	0.219	0.131	0.324	0.023	0.292	0.042	0.620	<0.001
sTWEAK	0.076	0.606	0.145	0.321	0.114	0.434	0.335	0.019	0.326	0.005
cFn	0.299	0.099	0.224	0.072	0.134	0.360	0.225	0.092	0.427	<0.001
S100	0.244	0.092	0.240	0.096	0.225	0.120	0.191	0.188	0.350	0.009
ENE	0.203	0.052	0.369	0.006	0.275	0.068	0.017	0.909	0.299	0.039

\* C.P. = coeficiente de Pearson

**Tabla 17.** Correlación entre las hipointensidades en RM y los marcadores moleculares y neurosonológicos en pacientes con migraña episódica.

### 6.3.5. INFLUENCIA DE LOS MARCADORES MOLECULARES Y NEUROSONOLÓGICOS SOBRE EL VOLUMEN DE LAS HIPOINTENSIDADES EN RM

Para analizar detalladamente la influencia de los marcadores moleculares y neurosonológicos sobre las hipointensidades observadas en cada estructura cerebral se asignó arbitrariamente una (1) “casilla” por cada 0.100 puntos del coeficiente de Pearson, con un color diferente según el mecanismo fisiopatológico (figura 35). La finalidad era estudiar el influjo sobre el volumen de las hipointensidades que tienen los diferentes marcadores moleculares de inflamación sistémica (IL-6, IL-10, PCR, TNF-alfa), marcadores de inflamación neurogénica (CGRP), marcadores de disfunción endotelial (VDE, PTX-3, sTWEAK), disrupción de BHE (cFn) y de daño cerebral (S100, ENE) en el grupo de pacientes con migraña episódica y migraña crónica.



**Figura 35.** Representación gráfica de la influencia de los distintos marcadores moleculares sobre una de las regiones de interés (sustancia gris periacueductal).

Los hallazgos más relevantes han sido los siguientes (tabla 18):

Los marcadores de inflamación sistémica tienen mayor influencia sobre las hipointensidades de RM en los pacientes con migraña episódica que en los sujetos con migraña crónica, sobre todo a nivel de la sustancia gris periacueductal (13 casillas en migraña episódica vs. 7 casillas en migraña crónica). En la migraña crónica el mayor influjo sobre las hipointensidades se evidencia en el núcleo rojo (8 casillas).

Los marcadores de inflamación neurogénica tienen también mayor influjo sobre las hipointensidades en los pacientes con migraña episódica que en los afectados de migraña crónica, sobre todo a nivel del núcleo rojo (8 casillas) y sustancia gris periacueductal (8 casillas).

Los marcadores de disfunción endotelial tienen incluso mayor influencia sobre las hipointensidades en los pacientes con migraña episódica que en los sujetos con migraña crónica, mayormente a nivel de la sustancia gris periacueductal (23 casillas), núcleo dentado (10 casillas) y núcleo rojo (12 casillas).

Por el contrario, los marcadores de disrupción de BHE influyen en mayor grado sobre las hipointensidades, observadas en la RM, en los pacientes con migraña crónica que en los sujetos con migraña episódica, fundamentalmente a nivel de la sustancia gris periacueductal (8 casillas) y núcleo rojo (7 casillas).

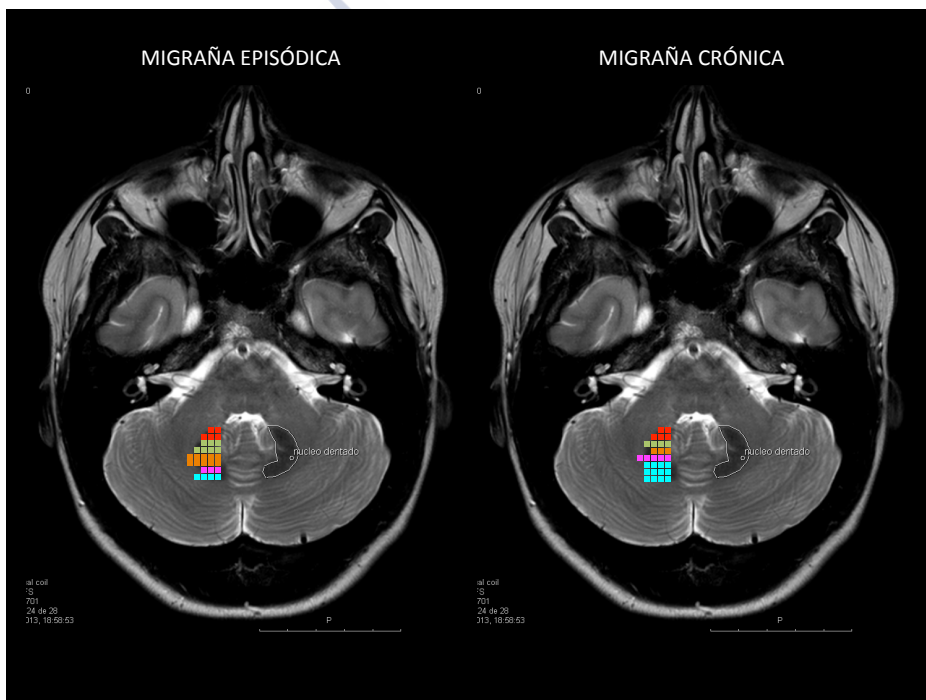
Asimismo, los marcadores de daño neuronal tiene mayor influjo sobre las hipointensidades en los pacientes con migraña crónica que en los afectados de migraña episódica, concretamente a nivel de sustancia gris periacueductal (15 casillas), núcleo dentado (12 casillas) y núcleo rojo (11 casillas).

Marcadores/ núcleos	Migraña episódica (nº de casillas)	Migraña crónica (nº de casillas)	p
<b><i>Inflamación sistémica</i></b>			< 0.0001
- Núcleo dentado	0.500 (5)	0.500 (5)	
- Núcleo rojo	0.800 (8)	0.800 (8)	
- Sustancia negra	0.600 (6)	0.500 (5)	
- Globo pálido	0.800 (8)	0.500 (5)	
-Sustancia gris periacueductal	1.300 (13)	0.700 (7)	
- TOTAL	<b>4.000 (40)</b>	<b>3.000 (30)</b>	
<b><i>Inflamación neurogénica</i></b>			0.005
- Núcleo dentado	0.700 (7)	0.400 (4)	
- Núcleo rojo	0.800 (8)	0.300 (3)	
- Sustancia negra	0.100 (1)	0.200 (2)	
- Globo pálido	0.300 (3)	0.300 (3)	
-Sustancia gris periacueductal	0.800 (8)	0.400 (4)	
- TOTAL	<b>2.700 (27)</b>	<b>1.600 (16)</b>	
<b><i>Disfunción endotelial</i></b>			< 0.0001
- Núcleo dentado	1.000 (10)	0.300 (3)	
- Núcleo rojo	1.200 (12)	0.500 (5)	
- Sustancia negra	0.600 (6)	0.200 (2)	
- Globo pálido	0.900 (9)	0.300 (3)	
-Sustancia gris periacueductal	2.300 (23)	0.700 (7)	
- TOTAL	<b>6.000 (60)</b>	<b>2.000 (20)</b>	
<b><i>Disrupción de BHE</i></b>			0.004
- Núcleo dentado	0.300 (3)	0.500 (5)	
- Núcleo rojo	0.200 (2)	0.700 (7)	
- Sustancia negra	0.100 (1)	0.300 (3)	
- Globo pálido	0.200 (2)	0.300 (3)	
-Sustancia gris periacueductal	0.400 (4)	0.800 (8)	
- TOTAL	<b>1.200 (12)</b>	<b>2.600 (26)</b>	
<b><i>Daño neuronal</i></b>			< 0.000
- Núcleo dentado	0.400 (4)	1.200 (12)	
- Núcleo rojo	0.600 (6)	1.100 (11)	
- Sustancia negra	0.500 (5)	0.700 (7)	
- Globo pálido	0.200 (2)	0.100 (1)	
- Sustancia gris periacueductal	0.600 (6)	1.500 (15)	
- TOTAL	<b>2.300 (23)</b>	<b>4.600 (46)</b>	

**Tabla 18.** Grado de influencia de los distintos marcadores sobre las hipointensidades en las regiones de interés evaluadas.

Si analizamos la influencia de los distintos marcadores en cada región de interés observamos lo siguiente:

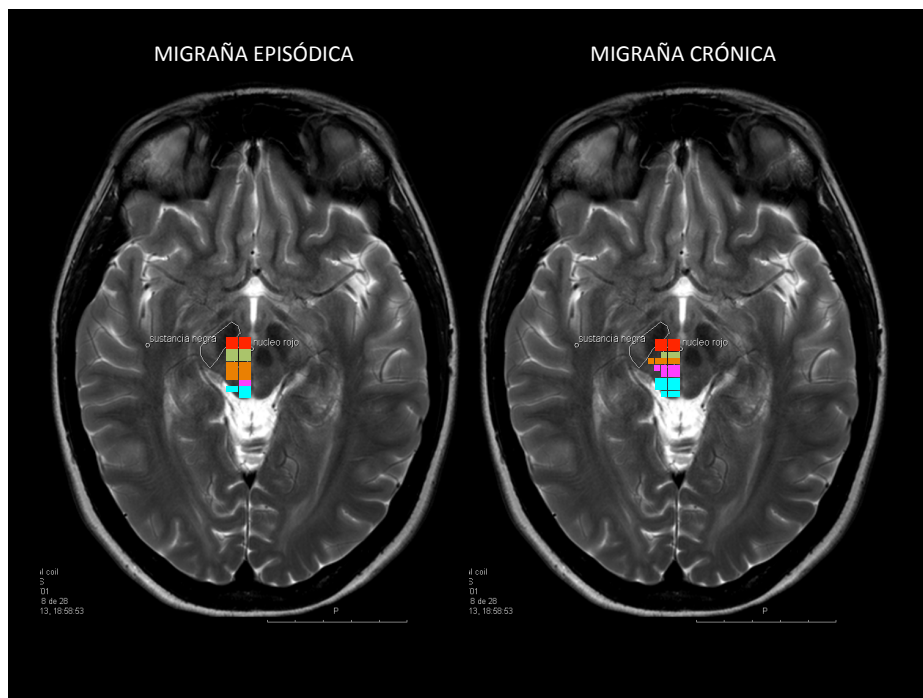
**Núcleo dentado:** las hipointensidades en el núcleo dentado en los pacientes con migraña episódica se asocian en mayor medida a marcadores de disfunción endotelial (naranja). En cambio en los pacientes con migraña crónica las hipointensidades se asocian sobre todo a marcadores de daño neuronal (azul), figura 36.



**Figura 36:** Representación gráfica de la influencia de los distintos marcadores moleculares en las hipointensidades a nivel del núcleo dentado en migraña episódica vs. migraña crónica.

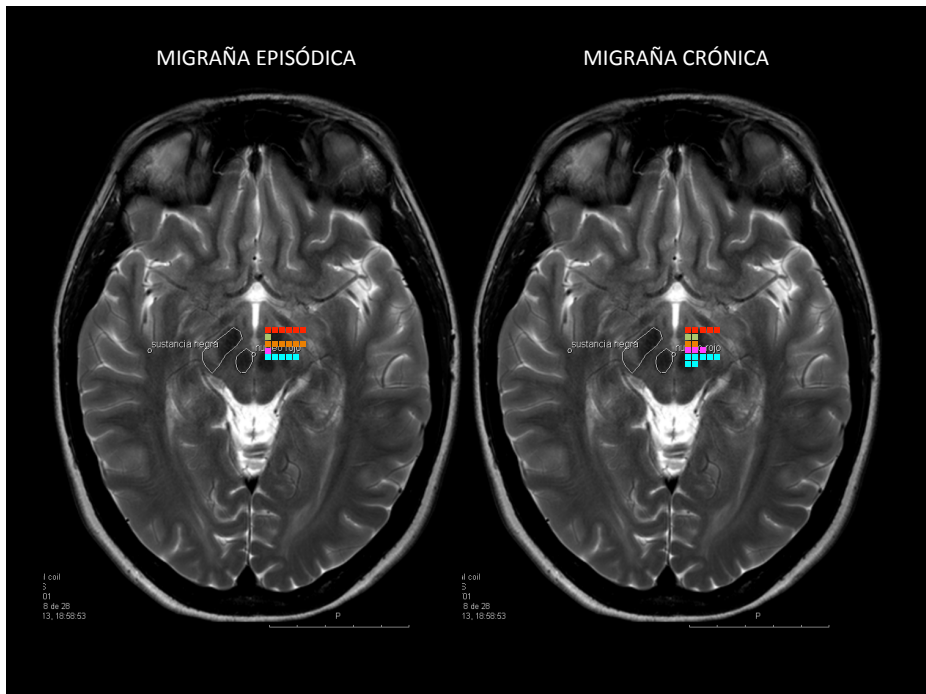
**Núcleo rojo:** los pacientes con migraña episódica presentan una mayor influencia de marcadores de disfunción endotelial (naranja),

seguido de marcadores de inflamación sistémica e inflamación neurogénica (rojo y verde respectivamente). En los pacientes con migraña crónica las hipointensidades en el núcleo rojo se asocian sobre todo con marcadores de daño neuronal (azul), figura 37.



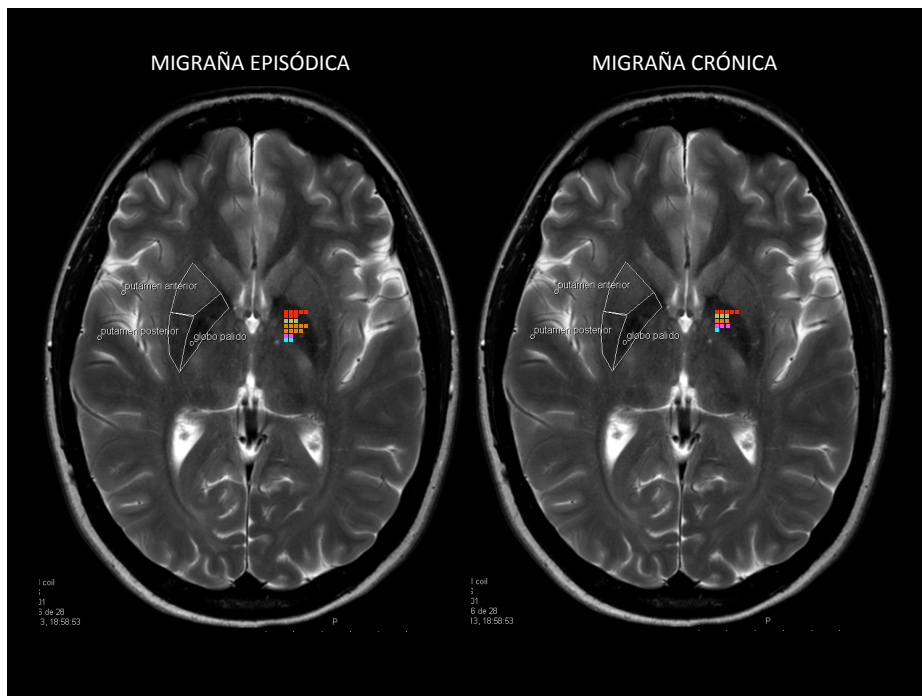
**Figura 37:** Representación gráfica de la influencia de los distintos marcadores moleculares en las hipointensidades a nivel del núcleo rojo en migraña episódica vs. migraña crónica.

**Sustancia negra:** Los pacientes con migraña episódica presentan una mayor influencia sobre el volumen de hipointensidad de los marcadores de inflamación (rojo) y disfunción endotelial (naranja). En los pacientes con migraña crónica el volumen de hipointensidad en la sustancia negra se asocia sobre todo con marcadores de daño neuronal (azul), figura 38.



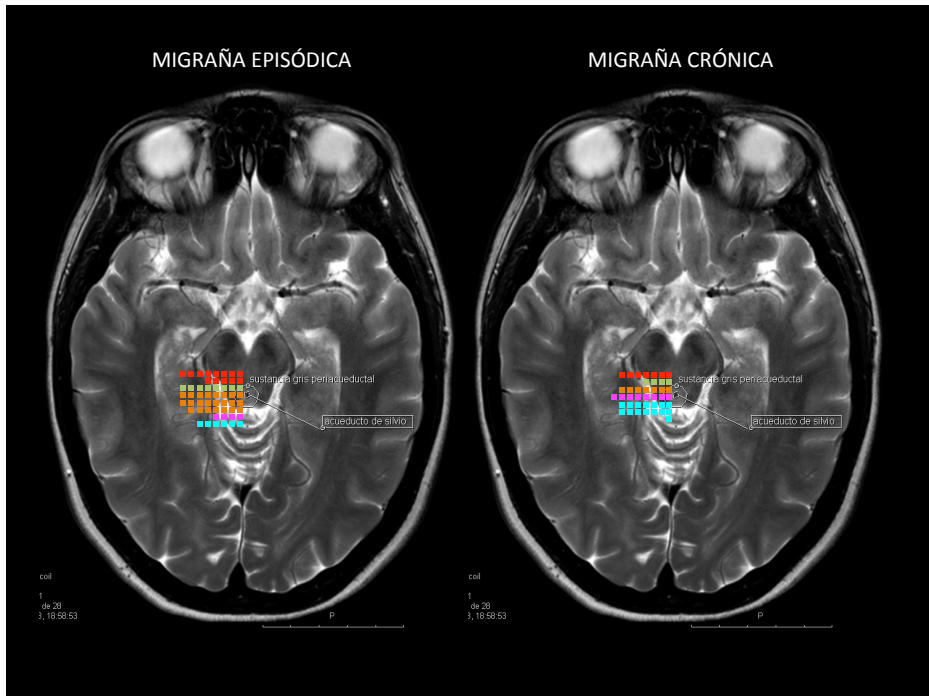
**Figura 38:** Representación gráfica de la influencia de los distintos marcadores moleculares en las hipointensidades a nivel de la sustancia negra en migraña episódica vs. migraña crónica.

Globo pálido: Los pacientes con migraña episódica presentan una mayor influencia de los marcadores de disfunción endotelial e inflamación sistémica (naranja y rojo respectivamente) sobre el volumen de hipointensidad en esta región. En los pacientes con migraña crónica influyen sobre todo los marcadores de disfunción neuronal (azul), figura 39.



**Figura 39:** Representación gráfica de la influencia de los distintos marcadores moleculares en las hipointensidades a nivel del globo pálido en migraña episódica vs. migraña crónica.

Sustancia gris periacueductal: los pacientes con migraña episódica presentan una mayor influencia de los marcadores de disfunción endotelial (naranja) e inflamación (rojo). En cambio, en los pacientes con migraña crónica, el volumen de hipointensidad en la sustancia gris periacueductal se asocia principalmente a marcadores de daño neuronal (azul), figura 40.



**Figura 40:** Representación gráfica de la influencia de los distintos marcadores moleculares en las hipointensidades a nivel de la sustancia gris periacueductal en migraña episódica vs. migraña crónica.



## 7. DISCUSIÓN





La migraña crónica es la principal complicación evolutiva de la migraña y actualmente es reconocida como una entidad diferenciada en la nueva clasificación de la IHS. Aunque en los últimos años hemos asistido a un gran número de importantes avances en el conocimiento de esta invalidante patología, siguen sin conocerse con exactitud los mecanismos que llevan a un paciente que padece migraña episódica a transformarse en un paciente con migraña crónica, o si esa transformación puede tener consecuencias a nivel cerebral.

Tradicionalmente se considera que la migraña es una patología benigna, que no ocasiona alteraciones estructurales a nivel del SNC. Sin embargo, investigaciones recientes han observado que los pacientes con migraña presentan lesiones a nivel cerebral, cuya etiología y verdadero significado todavía desconocemos. Asimismo, el estudio de los marcadores de inflamación, disfunción endotelial, disrupción de BHE y daño neuronal presentes en los pacientes con migraña ha estimulado la investigación en este campo de la neurología. Nuestro estudio intenta demostrar la presencia de alteraciones a nivel cerebral en los pacientes con migraña crónica y buscar los posibles mecanismos fisiopatológicos que expliquen la existencia de dichas alteraciones.

En este estudio se han investigado las posibles alteraciones a nivel cerebral evaluadas mediante neuroimagen y los distintos mecanismos patogénicos implicados en la migraña, tanto crónica como episódica, mediante determinación de marcadores moleculares y técnicas ultrasonográficas durante el período intercrítico.

Entre los posibles biomarcadores hemos seleccionado moléculas relacionadas con distintos procesos fisiopatológicos: IL-6, IL-10, TNF-alfa y PCR como marcadores de inflamación sistémica, CGRP como

molécula fundamental en los procesos de activación trigeminovascular e inflamación neurogénica, PTX-3 y sTWEAK como marcadores de disfunción endotelial, cFn como molécula implicada en la disrupción de BHE y S100 y ENE como marcadores de daño cerebral.

Diversos autores han estudiado las fluctuaciones de los niveles de marcadores de inflamación sistémica en pacientes con migraña, tanto en período intercrítico como durante las crisis de migraña, con resultados contradictorios.<sup>118-145</sup>. Recientemente se ha realizado una revisión sistemática sobre la importancia de estos marcadores en la migraña tanto en los períodos intercríticos como durante las crisis de migraña.<sup>118</sup>

Las investigaciones previas, realizadas durante el período interictal, señalan una elevación de IL-6 en los pacientes con migraña.<sup>118,121,122,125</sup> En consonancia con estos resultados, nosotros hemos encontrado que los pacientes con migraña crónica presentaban niveles significativamente más elevados de IL-6 que los pacientes con migraña episódica y que los controles, en el período interictal.

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria, por lo que cabría esperar que los pacientes con migraña presentasen un descenso de sus niveles séricos. Existen dos estudios publicados, con diferentes resultados. En uno de ellos demostraron un descenso de los niveles de IL-10 durante el período interictal en pacientes con migraña<sup>120</sup> mientras que en el otro no encontraron diferencias.<sup>121</sup> Nosotros hemos objetivado un descenso significativo de los niveles de IL-10 en pacientes con migraña crónica con respecto al grupo control.

Varios estudios han constatado la elevación de la PCR en pacientes con migraña<sup>135-141</sup>, aunque con resultados dispares al evaluar a los pacientes según el tipo de migraña (sin y con aura). En contraposición, otras seis publicaciones no detectaron diferencias entre pacientes con migraña y controles.<sup>142-145</sup> En nuestro estudio no evidenciamos diferencias significativas en los niveles de PCR entre sujetos control y sujetos con migraña. Es posible que esta diferencia pueda atribuirse al tamaño muestral, ya que en 3 de los 6 estudios que describen aumento de la PCR el tamaño de la muestra es mayor que el nuestro.

Respecto a los niveles de TNF-alfa, tampoco hemos encontrado diferencias entre el grupo control y migraña. Estos resultados son concordantes con la mayoría de estudios realizados durante el período interictal, en los que no se observan diferencias significativas.<sup>119-122</sup>

El CGRP es la molécula implicada con mayor consistencia en la activación del sistema trigeminovascular. Ha sido objeto de numerosas investigaciones en la última década tanto en modelos animales como en humanos. Por su potente acción vasodilatadora y facilitadora de la nocicepción, el CGRP desempeña un papel crucial en la activación del sistema trigeminovascular, la inflamación neurogénica y el desarrollo de sensibilización central. Distintos autores señalan un aumento de los niveles de CGRP en sangre extraída tanto en vena yugular ipsilateral<sup>91,92</sup> como en vena cubital<sup>94,95</sup> durante el período ictal. Resultados similares han sido encontrados en estudios realizados durante el período interictal.<sup>96,97</sup> Pascual et al. han demostrado la elevación de CGRP en sangre periférica, durante el período interictal, en pacientes con migraña crónica.<sup>100</sup> Estos autores postulan que CGRP podría constituir el primer biomarcador de migraña crónica, útil tanto

para su diagnóstico como para el seguimiento de la respuesta al tratamiento.<sup>106</sup> En nuestro trabajo los niveles de CGRP estaban significativamente más elevados durante el período interictal en los pacientes con migraña crónica que en los pacientes con migraña episódica y que en los controles. Nuestros resultados son concordantes con la mayoría de la bibliografía publicada hasta la fecha, y sugieren que en los pacientes con migraña crónica existe una activación del sistema trigeminovascular casi permanente, que justificaría la presencia de dolor de forma casi continua.

Por lo tanto, y en base a estos hallazgos, podemos concluir que los pacientes con migraña crónica presentan un estado de inflamación mayor que los pacientes con migraña episódica y que los sujetos sanos, y persistente, ya que hemos detectado alteraciones incluso fuera de las crisis de migraña. Estos resultados orientan hacia la posibilidad de que en la migraña crónica exista un estado de neuroinflamación persistente.

En los últimos años diversos autores han señalado a PTX3 y sTWEAK como nuevos marcadores de disfunción endotelial. PTX3 es una glicoproteína que forma parte de la familia de las pentraxinas, al igual que la PCR. En contraposición a la PCR, que se sintetiza en el hígado y se libera a nivel sistémico, PTX3 se sintetiza en la pared vascular, por lo que se cree que refleja la inflamación del endotelio y que, por tanto, constituye un marcador de la función endotelial.<sup>169,170</sup> Las investigaciones realizadas hasta la fecha han observado niveles elevados de PTX3 en sangre periférica de pacientes con enfermedad cardiovascular y aterosclerosis, y sugieren que PTX3 constituye un nuevo marcador de disfunción endotelial como paso previo a la

formación de la placa de ateroma y del proceso de aterosclerosis propiamente dicho.<sup>168,171</sup> Otro estudio ha demostrado una correlación entre los niveles de PTX3 y VDE en pacientes con enfermedad coronaria.<sup>169</sup>

sTWEAK es una citocina miembro de la familia del TNF con múltiples funciones, que dependen del contexto clínico y de célula sobre la que actúa. Los estudios realizados han constatado un descenso de sTWEAK en pacientes con enfermedades cardiovasculares, arteriopatía periférica e insuficiencia renal crónica.<sup>171,172,176</sup> Por ello estos autores proponen a sTWEAK como un nuevo biomarcador de disfunción endotelial y aterosclerosis.

Hasta la fecha ningún estudio ha investigado el papel de ambos marcadores en la migraña. Nosotros hemos encontrado un aumento significativo de los niveles de PTX3 y sTWEAK en pacientes con migraña comparado con los sujetos control. Los pacientes con migraña crónica tienen niveles más elevados de PTX3 que los pacientes con migraña episódica y que los controles, sin embargo, en el caso de sTWEAK, los pacientes con migraña crónica presentan un descenso de los niveles en comparación con el grupo migraña episódica. Las investigaciones previas señalan que los pacientes con aterosclerosis presentan un descenso de sTWEAK. A pesar de que sTWEAK es una citocina con acción principalmente pro-inflamatoria, estos autores postulan que, en el caso de la enfermedad aterosclerótica, tiene una acción anti-inflamatoria. Otra teoría es que sTWEAK es liberado en menores cantidades por la placa de ateroma que por el endotelio sano.<sup>172</sup> Ambas hipótesis sugieren que los pacientes con migraña crónica tienen un mayor grado de disfunción endotelial que los

pacientes con migraña episódica y que por tanto, podrían tener un mayor riesgo vascular.

Además de los marcadores moleculares de disfunción endotelial, hemos evaluado la posible alteración de la función del endotelio mediante la técnica ultrasonográfica de vasodilatación dependiente de endotelio (VDE). Se han realizado diversos estudios sobre la VDE en migraña durante el período intercrítico, con resultados dispares y predominantemente negativos.<sup>208-212</sup> Nosotros hemos evidenciado una mayor reducción del porcentaje de VDE en los pacientes con migraña crónica, en comparación con el grupo de migraña episódica y controles sanos. La reducción de los valores de VDE, junto con el aumento de PTX3 y sTWEAK, sugiere que los pacientes con migraña crónica presentan un mayor grado de disfunción endotelial a nivel sistémico que los pacientes con migraña episódica y controles, que se ve expresada en una disminución de la capacidad de vasodilatación del endotelio y un aumento de marcadores de daño vascular.

Investigaciones previas realizadas en modelos animales<sup>206</sup> y en pacientes con migraña han demostrado que durante las crisis de migraña se produce una elevación de marcadores moleculares de disrupción de la BHE, al observar una elevación de MMP-9 en sangre periférica.<sup>214</sup> En nuestro estudio hemos seleccionado la cFn como marcador de disrupción de BHE. La cFn es una glicoproteína que forma parte de la matriz extracelular de la BHE. Distintos autores han señalado la elevación de cFn en pacientes con ictus isquémico o tras la transformación hemorrágica secundaria a tratamiento trombolítico del ictus agudo<sup>218,219</sup>, aunque por el momento no se ha evaluado este marcador en pacientes con migraña. Nosotros proponemos que cFn

puede ser mejor marcador de disrupción de barrera en la migraña. En nuestro estudio hemos observado que los pacientes con migraña crónica presentan mayores niveles de cFn que el grupo migraña episódica y control. Estos datos sugieren que la disrupción de la BHE, evaluada a través de cFn, podría estar implicada en los mecanismos fisiopatológicos de la migraña crónica y en la cronificación del dolor.

Existen pocos estudios sobre el papel que desempeñan S100 y ENE como marcadores de daño neuronal y glial en la migraña, y los resultados son dispares. En el año 2011 Yilmaz et al. constataron un aumento de S100 tanto en período ictal como interictal y aumento de ENE únicamente durante las crisis en pacientes con migraña sin aura<sup>227</sup>. Estos autores postulaban que la elevación de S100 era consecuencia de la activación glial durante las crisis de migraña y que podría constituir un marcador de daño glial y/o neuronal. El hecho de que los niveles de S100 fueran mayores durante el período interictal, podría sugerir que los pacientes con migraña presentan activación glial y disrupción de la BHE incluso fuera de las crisis de migraña. Por el contrario, otro estudio realizado por estos mismos autores constató un descenso de S100 durante el período interictal en pacientes con migraña con y sin aura, sin encontrar una clara explicación.<sup>228</sup> Teepker et al. también observaron niveles de S100 aumentados, pero los niveles de ENE eran menores en los pacientes con migraña que en los controles. Los autores atribuyen el descenso de los niveles de ENE a una pérdida neuronal. Nosotros hemos objetivado niveles de S100 y ENE aumentados en los pacientes con migraña crónica, durante el período interictal, en comparación con los pacientes con migraña episódica y los controles. Nuestros resultados sugieren que los

pacientes con migraña crónica presentan una mayor activación glial incluso durante el período interictal y un mayor daño neuronal que los pacientes con migraña episódica y los sujetos sanos.

Los estudios de neuroimagen cada vez cobran mayor valor e importancia en la comprensión de la fisiopatología de la migraña. Investigaciones previas han descrito alteraciones tanto anatómicas como funcionales en el cerebro de los pacientes con migraña. Nosotros nos hemos propuesto estudiar las alteraciones estructurales que aparecen en la RM. Para ello realizamos una RM encefálica 3T a todos los pacientes con migraña crónica, migraña episódica y a controles sanos, y analizamos la presencia de hiperseñales de sustancia blanca, hipointensidades en ganglios basales y tronco cerebral y lesiones isquémicas silentes. Además hemos estudiado la relación entre la presencia de lesiones y las distintas variables clínicas, moleculares y neurosonológicas.

Los pacientes con migraña crónica presentaban hiperseñales con más frecuencia que los pacientes con migraña episódica y que los controles (60% vs. 19,3% vs. 14,3%,  $p < 0.0001$ ). Además los pacientes con migraña crónica presentaban un mayor número de hiperseñales de sustancia blanca (> 6 lesiones) que los pacientes con migraña episódica y que los controles (en ninguno de los controles se contabilizaron más de 6 lesiones de sustancia blanca). La mayoría de las hiperseñales se localizaban a nivel subcortical y periventricular. Nuestros resultados son concordantes con los hallazgos de estudios previos, que señalan que los pacientes con migraña presentan un mayor número de hiperseñales de sustancia blanca.<sup>241-250</sup> Sin embargo, y a diferencia del estudio CAMERA-1, no hemos objetivado

hiperseñales a nivel infratentorial<sup>245,246</sup>, pero sí encontramos una relación significativa entre la presencia de hiperseñales y la frecuencia de las crisis (los pacientes con migraña crónica presentan más hiperseñales que los pacientes con migraña episódica). También hemos observado una relación entre la presencia de hiperseñales y el tiempo de evolución de la migraña. Así, cuanto mayor era el tiempo de evolución, mayor porcentaje de pacientes afectados y mayor número de hiperseñales de sustancia blanca. Esta asociación no ha sido descrita previamente.

Se han establecido diversas hipótesis para explicar el origen de las hiperseñales de sustancia blanca. Es posible que sean consecuencia de la combinación de varios de los mecanismos fisiopatológicos de la migraña, que con la repetición de las crisis y el paso del tiempo, den lugar a un daño estructural permanente. Se han relacionado con mecanismos de inflamación neurogénica, disrupción de la integridad de la BHE, vasoconstricción, estados protrombóticos o incluso anomalías cardíacas (como el foramen oval permeable). Nosotros hemos intentado encontrar una posible explicación a la existencia de estas lesiones, comparando los niveles de los distintos marcadores moleculares y neurosonológicos en pacientes con hiperseñales y sin ellas. Observamos que los pacientes con migraña crónica que tienen hiperseñales de sustancia blanca presentan una elevación significativa de IL-6, cFn, ENE y una disminución de la VDE con respecto a los pacientes con migraña crónica que no presentan hiperseñales de sustancia blanca. Estos resultados sugieren que los pacientes con hiperseñales de sustancia blanca presentan un estado de inflamación y disfunción endotelial, con pérdida de la integridad de la BHE, que

facilitaría el acceso al SNC de agentes externos (que normalmente no atraviesan la BHE), que podrían inducir un mayor daño neuronal.

Otra de las variables evaluadas ha sido la presencia de hipointensidades a nivel de los ganglios basales y de la sustancia gris periacueductal, que indican regiones de depósito de hierro. La acumulación de hierro en un tejido determinado da lugar a señales hipointensas en imágenes de RM. Este efecto es acumulativo, y por ello, cuanto mayor sea la cantidad de hierro presente, mayor será la hipointensidad en secuencias T2 (es decir, menor señal de intensidad). Las imágenes fueron adquiridas en una RM 3T, y se normalizaron a la misma escala de grises, para poder compararlas entre sí. Posteriormente se segmentó a los tejidos según el grado de intensidad en cuatro grupos, y se cuantificó el volumen de aquellas zonas con un valor en escala de grises normalizada inferior a 65, ya que estas zonas correspondían con áreas claramente hipointensas y por tanto, con zonas con acúmulo de hierro. Además se calculó el valor medio de la escala de grises en cada área concreta, para cuantificar el grado de hipointensidad. El análisis de las hipointensidades se realizó en 6 regiones de interés de los ganglios de la base: globo pálido, núcleo rojo, sustancia negra, núcleo dentado, núcleo caudado y putamen. También evaluamos las hipointensidades en la sustancia gris periacueductal, sin hacer ningún proceso de segmentación, ya que con la metodología previa no encontramos ningún área con intensidad por debajo de 65.

No detectamos hipointensidades a nivel del núcleo caudado y putamen, según el criterio de definición que aplicamos (es decir, una intensidad menor de 65), por lo que estas dos regiones no se incluyeron en el análisis estadístico. Los pacientes con migraña crónica

presentaban hipointensidades de mayor volumen que los pacientes con migraña episódica y que los controles en todas las regiones seleccionadas (núcleo dentado, núcleo rojo, sustancia negra, globo pálido y sustancia gris periacueductal), sobre todo en el núcleo rojo y la sustancia gris periacueductal. Mediante el análisis de la curva COR establecimos un punto de corte para el diagnóstico de migraña crónica en estas dos estructuras, mostrando que una hipointensidad en el núcleo rojo de  $> 15$  microL identificaría a pacientes con migraña crónica con una sensibilidad del 80% y con una especificidad del 71% y una hipointensidad en la sustancia gris periacueductal  $> 240$  microL identificaría a pacientes con migraña crónica con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 97%.

Nuestros resultados coinciden con investigaciones previas, en las que han objetivado acúmulo de hierro a nivel de la sustancia gris periacueductal<sup>281</sup> y ganglios de la base<sup>282,283</sup>, áreas implicadas en el procesamiento del dolor a nivel central.<sup>284-289</sup> Welch et al. observaron una mayor cantidad de hierro en la sustancia gris periacueductal en pacientes con migraña y cefalea crónica diaria, que se correlacionaba con el tiempo de evolución de la cefalea.<sup>281</sup> Posteriormente Kruit et al. corroboraron estos hallazgos y demostraron un aumento de los depósitos de hierro en el núcleo rojo, putamen y globo pálido en los pacientes con migraña menores de 50 años y, la misma correlación con el tiempo de evolución.<sup>282</sup> Tepper et al. señalaron que la hipointensidad a nivel del globo pálido en secuencias T2 permitía diferenciar a pacientes con migraña crónica de migraña episódica.<sup>291</sup> Nosotros, a diferencia de las investigaciones previas, no hemos observado una relación entre el volumen de hipointensidad y el tiempo

de evolución de la migraña; sin embargo, al igual que Tepper et al, sí constatamos una relación entre el volumen de hipointensidad en el globo pálido y la frecuencia de las crisis en los pacientes con migraña crónica. Es posible que en los otros estudios, al no haber realizado una normalización de las imágenes, la edad de los pacientes produzca un artefacto en el análisis de las señales (ya que con la edad se produce de forma fisiológica un acúmulo de hierro en los tejidos).

Se desconoce si el acúmulo de hierro es una respuesta fisiológica inducida por la activación repetida de estas estructuras implicadas en el procesamiento del dolor, o si se trata de un proceso patológico que provoca daño permanente. Los estudios funcionales han demostrado la activación de la sustancia gris periacueductal, el núcleo rojo y la sustancia negra durante las crisis de migraña.<sup>284-289</sup> Se postula que la hiperemia que se produce en estas zonas, asociada al daño celular por el aumento de radicales libres, contribuye al depósito de hierro.

Nuestra hipótesis es que la reiteración de las crisis produce un aumento de los depósitos de hierro en los ganglios de la base y la sustancia gris periacueductal, como respuesta a los propios mecanismos que generan los ataques de migraña. Para apoyar nuestra hipótesis hemos buscado una posible relación entre el volumen de hipointensidad y los marcadores moleculares de inflamación sistémica y neurogénica, disrupción de BHE, disfunción endotelial y daño neuronal. Como hallazgos más relevantes hemos constatado que los pacientes con migraña presentan una correlación positiva entre: 1) marcadores de inflamación (IL-6 y CGRP) y el volumen de hipointensidad en núcleo rojo y sustancia gris periacueductal ; 2) entre marcadores de disfunción endotelial (VDE y PTX3) y el volumen de

hipointensidad en sustancia gris periacueductal; 3) entre marcadores de disrupción de BHE (cFn) y el volumen de hipointensidad en núcleo dentado, núcleo rojo y sustancia gris periacueductal; y 4) entre marcadores de daño neuronal (S100 y ENE) y el volumen de hipointensidad en núcleo dentado, núcleo rojo y sustancia gris periacueductal. En resumen, las áreas que presentan mayor acúmulo de hierro (núcleo rojo y sustancia gris periacueductal) coinciden con las áreas sobre las que tienen mayor influencia los marcadores de inflamación, disfunción endotelial, disrupción de BHE y daño cerebral.

Los pacientes con migraña crónica presentan muy buena correlación entre los marcadores de disrupción de BHE y de daño cerebral y el volumen de hipointensidad. Por el contrario, en los pacientes con migraña episódica existe muy buena correlación entre los marcadores de inflamación, disfunción endotelial y disrupción de barrera, pero desaparece la relación entre los marcadores de daño neuronal y volumen de hipointensidad. Por tanto, en los pacientes con migraña crónica parece existir una mayor influencia de los mecanismos de disrupción de BHE y de daño cerebral, sobre todo a nivel del núcleo rojo y la sustancia gris periacueductal. En cambio, en los pacientes con migraña episódica parece existir una mayor influencia de los mecanismos de inflamación y disfunción endotelial, sobre todo a nivel de núcleo rojo y sustancia gris periacueductal.

Para entender mejor esta relación, hemos realizado una representación gráfica de la influencia de cada uno de los mecanismos fisiopatológicos de la migraña sobre cada una de las estructuras cerebrales evaluadas. Para ello, por cada 0.100 puntos del coeficiente de Pearson, asignamos arbitrariamente 1 casilla con un color distinto

según el tipo de mecanismo. Esta representación gráfica confirma de nuevo que en las hipointensidades de los pacientes con migraña episódica influyen principalmente mecanismos de inflamación sistémica y neurogénica y disfunción endotelial, sobre todo en el núcleo rojo y sustancia gris periacueductal. Por el contrario, los mecanismos de disrupción de BHE y daño neuronal influyen en mayor grado en los pacientes con migraña crónica, sobre todo en la sustancia gris periacueductal y núcleo rojo.

Nuestras observaciones sugieren que los pacientes con migraña crónica presentan un mayor acúmulo de hierro, sobre todo a nivel de núcleo rojo y sustancia gris periacueductal, que los pacientes con migraña episódica y los controles. Las investigaciones previas han demostrado que estas estructuras están implicadas en el procesamiento del dolor, por lo que es posible que el acúmulo de hierro en los pacientes con migraña crónica condicione un daño cerebral permanente y contribuya a la cronificación del dolor. El acúmulo de hierro, por tanto, podría ser el resultado de la repetición de las crisis de migraña, en las que se produce un estado de inflamación persistente, disfunción endotelial, disrupción de BHE y daño neuronal. De modo que a mayor frecuencia de las crisis (migraña crónica), mayor acúmulo de hierro.

Estos resultados vislumbran la existencia en la migraña crónica, de un sistema de dolor disfuncional subyacente. Las investigaciones en modelos experimentales apuntan a una disfunción en la modulación del sistema descendente del dolor que facilitaría las aferencias nociceptivas en ausencia de daño tisular. Mientras que en la migraña episódica el sistema descendente de dolor es capaz de activarse y

frenar la actividad desencadenada por el ataque de migraña, se especula que en la migraña crónica dicho sistema no se activa o lo hace en menor medida y por tanto no frena (o incluso facilita) la activación pronociceptiva. Dependiendo del grado de desequilibrio existente entre activación y frenado de ambos sistemas se producirán casos de migraña crónica de gravedad variable. Las enfermedades comórbidas y factores de riesgo actuarían como facilitadores del sistema haciendo al individuo susceptible. Esto podría explicar, junto con una base genética, por qué determinados individuos desarrollan esta complicación de la migraña mientras la gran mayoría evoluciona favorablemente.

En nuestro estudio, a diferencia de otras investigaciones previas<sup>245,246,248,268</sup>, no hemos encontrado lesiones isquémicas silentes en los sujetos incluidos (migraña y controles).

La mayor limitación de este estudio procede del propio concepto de migraña crónica y episódica. Ambos son estados dinámicos, en los que un sujeto puede pasar de una situación a otra a largo del tiempo. Al tratarse de un estudio transversal, hemos realizado un análisis puntual de pacientes diagnosticados de migraña crónica que podrían revertir a migraña episódica, por lo que serían necesarios estudios longitudinales que confirmasen estos hallazgos. Otras limitaciones de nuestro estudio derivan del tamaño muestral que dificulta la valoración adecuada en subgrupos de pacientes con migraña sin y con aura, influencia de los fármacos sintomáticos y preventivos en las determinaciones moleculares, así como la presencia de comorbilidades que puedan influir en los resultados de estos marcadores.



## 8. CONCLUSIONES





1. Los pacientes con migraña crónica presentan un estado de inflamación persistente, detectable durante el período intercrítico por medio de marcadores de inflamación neurogénica y sistémica.

2. Los pacientes con migraña crónica presentan una alteración de la función endotelial que se asocia a cambios moleculares y neurosonológicos durante el período intercrítico.

3. Los pacientes con migraña crónica presentan una elevación de marcadores de disrupción de la barrera hematoencefálica y de daño neuronal. Estas alteraciones pueden ser detectadas fuera de las crisis de migraña.

4. Los pacientes con migraña crónica presentan alteraciones en las pruebas de neuroimagen (hiperseñales en sustancia blanca e hipointensidades en ganglios de la base y sustancia gris periacueductal).

5. La presencia y número de hiperseñales de sustancia blanca guardan una relación directa con el tiempo de evolución de la migraña. Asimismo, las hiperseñales se correlacionan con marcadores de inflamación, daño endotelial, disfunción de barrera hematoencefálica y daño neuronal.

6. Los pacientes con migraña crónica presentan un aumento de hipointensidades (depósitos de hierro) en los ganglios basales y la sustancia gris periacueductal. Estas hipointensidades se asocian a un

estado de inflamación persistente, daño endotelial, disrupción de BHE y daño neuronal.

7. Las hipointensidades observadas a nivel del núcleo rojo y sustancia gris periacueductal en pacientes con migraña crónica guardan una relación estrecha con marcadores de disrupción de barrera hematoencefálica y de daño neuronal.

8. No hemos constatado la presencia de lesiones isquémicas silentes en los pacientes con migraña crónica.



## 9. BIBLIOGRAFÍA





1. Headache Classification Committee of the International Headache Society. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. *Cephalalgia*. 1988;8 (Suppl 7):S1-S96.
2. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia*. 2004;24 (Suppl 1):S9-S160.
3. Silberstein SD, Olesen J, Bousser MG, Diener HC, Dodick D, First M, Goadsby PJ, Göbel H, Lainez MJ, Lance JW, Lipton RB, Nappi G, Sakai F, Schoenen J, Steiner TJ; International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders, 2nd edition (ICHD-II). Revision of criteria for 8.2. Medication-overuse headache. *Cephalalgia*. 2005;25:460-465.
4. Olesen J, Bousser MG, Diener HC, Dodick D, First M, Goadsby PJ, Göbel H, Lainez MJ, Lance JW, Lipton RB, Nappi G, Sakai F, Schoenen J, Silberstein SD, Steiner TJ; Headache Classification Committee. New appendix criteria open for a broader concept of chronic migraine. *Cephalalgia*. 2006;26:742-746.
5. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia*. 2013;33:629-808.
6. Guerrero ÁL, Rojo E, Herrero S, Neri MJ, Bautista L, Peñas ML, Cortijo E, Mulero P, Fernández R. Characteristics of the first 1000 headaches in an outpatient clinic registry. *Headache*. 2011;51:226-231.
7. Silberstein SD. Migraine. *Lancet*. 2004;363:381-391.
8. Menken M, Munsat TL, Toole JF. The global burden of disease study: implications for Neurology. *Arch Neurol*. 2000;57:418-420.
9. Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache*. 2001;41:646-657.
10. Mathew NT, Reuveni U, Perez F. Transformed or evolutive migraine. *Headache*. 1987;27:102-106.

11. Silberstein SD, Lipton RB, Solomon S, Mathew NT. Classification of daily and near daily headaches: Proposed revisions to the IHS criteria. *Headache*. 1994;34:1-7.
12. Lipton RB. Chronic migraine, classification, differential diagnosis, and epidemiology. *Headache*. 2011;51 (Suppl 2):S77-S83.
13. Castillo J, Muñoz P, Guitera V, Pascual J. Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache*. 1999;39:190-196.
14. Manack AN, Buse DC, Lipton RB. Chronic migraine: epidemiology and disease burden. *Curr Pain Headache Rep*. 2011;15:70-78.
15. Natoli JL, Manack A, Dean B, Butler Q, Turkel CC, Stovner L, Lipton RB. Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia*. 2010;30:599-609.
16. Pozo-Rosich P. Migraña crónica: epidemiología e impacto. *Rev Neurol*. 2012;45 (Suppl 2):S3-S11.
17. Hagen K, Zwart JA, Vatten L, Stovner LJ, Bovim G. Prevalence of migraine and non-migrainous headache: head-HUNT, a large population-based study. *Cephalalgia*. 2000;20:900-906.
18. Lantéri-Minet M, Auray JP, El Hasnaoui A, Dartigues JF, Duru G, Henry P, Lucas C, Pradalier A, Chazot G, Gaudin AF. Prevalence and description of chronic daily headache in the general population in France. *Pain*. 2003;102:143-149.
19. Queiroz LP, Barea LM, Blank N. An epidemiological study of headache in Florianopolis, Brazil. *Cephalalgia*. 2006;26:122-127.
20. Lu SR, Fuh JL, Chen WT, Juang KD, Wang SJ. Chronic daily headache in Taipei, Taiwan: prevalence, follow-up and outcome predictors. *Cephalalgia*. 2011;21:980-986.
21. Scher AI, Stewart WF, Liberman J, Lipton RB. Prevalence of frequent headache in a population sample. *Headache*. 1998;38:497-506.
22. Matias-Guiu J, Porta-Etessam J, Mateos V, Díaz-Insa S, López-Gil A, Fernández C; Scientific Committee of the PALM Program. One-year

- prevalence of migraine in Spain: a nationwide population-based survey. *Cephalalgia*. 2011;31:463-470.
23. Centers for Disease Control (CDC). Prevalence of chronic migraine headaches. United States, 1980-1989. *MMWR Mortal Wkly Rep*. 1991;40:331-338.
  24. Göbel H, Petersen-Braun M, Soyka D. The epidemiology of headache in Germany: a nationwide survey of a representative simple on the basis of the headache classification of the International Headache Society. *Cephalalgia*. 1994;14:97-106.
  25. Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. Interrelations between migraine and tension-type headache in the general population. *Arch Neurol*. 1992;49:914-918.
  26. Gracia-Naya M, Alarcia-Alejos R, Modrego-Pardo PJ. Importancia de la migraña crónica en una consulta general de neurología. *Rev Neurol*. 2008;46:577-581.
  27. Lipton RB, Bigal ME, Diamond M, Freitag F, Reed ML, Stewart WF; AMPP Advisory Group. Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. *Neurology*. 2007;68:343-349.
  28. Bigal ME, Serrano D, Buse D, Scher A, Stewart WF, Lipton RB. Acute migraine medications and evolution from episodic to chronic migraine: a longitudinal population-based study. *Headache*. 2008;48:1157-1168.
  29. Manack A, Buse DC, Serrano D, Turkel CC, Lipton RB. Rates, predictors, and consequences of remission from chronic migraine to episodic migraine. *Neurology*. 2011;76:771-718.
  30. Blumenfeld AM, Varon SF, Wilcox TK, Buse DC, Kawata AK, Manack A, Goadsby PJ, Lipton RB. Disability, HRQoL and resource use among chronic and episodic migraineurs: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *Cephalalgia*. 2011;31:301-315.
  31. Bloudek LM, Stokes M, Buse DC, Wilcox TK, Lipton RB, Goadsby PJ, Varon SF, Blumenfeld AM, Katsarava Z, Pascual J, Lanteri-Minet M, Cortelli P, Martelletti P. Cost of healthcare for patients with migraine in five European

- countries: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *J Headache Pain*. 2012;13:361-378.
32. Munakata J, Hazard E, Serrano D, Klingman D, Rupnow MF, Tierce J, Reed M, Lipton RB. Economic burden of transformed migraine: results of the American Migraine Prevalence and Prevention (AMPP) Study. *Headache*. 2009;49:498-508.
  33. Stokes M, Becker WJ, Lipton RB, Sullivan SD, Wilcox TK, Wells L, Manack A, Proskorovsky I, Gladstone J, Buse DC, Varon SF, Goadsby PJ, Blumenfeld AM. Cost of health care among patients with chronic and episodic migraine in Canada and the USA: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *Headache*. 2011;51:1058-1077.
  34. Bigal ME, Lipton RB. Clinical course in migraine: conceptualizing migraine transformation. *Neurology*. 2008;71:848-855.
  35. Bigal ME, Lipton RB. Modifiable risk factors for migraine progression. *Headache*. 2006;46:1334-1343.
  36. Bigal ME, Lipton RB. Concepts and mechanisms of migraine chronification. *Headache*. 2008;48:7-15.
  37. Katsarava Z, Schneeweiss S, Kurth T, Kroener U, Fritsche G, Eikermann A, Diener HC, Limmroth V. Incidence and predictors for chronicity of headache in patients with episodic migraine. *Neurology*. 2004;62:788-790.
  38. Bigal ME, Lipton RB. Obesity is a risk factor for transformed migraine but not chronic tension-type headache. *Neurology*. 2006;67:252-257.
  39. Colás R, Muñoz P, Temprano R, Gómez C, Pascual J. Chronic daily headache with analgesic overuse: epidemiology and impact on quality of life. *Neurology*. 2004;62:1338-1342.
  40. Bigal ME, Serrano D, Reed M, Lipton RB. Chronic migraine in the population: burden, diagnosis, and satisfaction with treatment. *Neurology*. 2008;71:559-566.
  41. Evers S, Gralow I, Bauer B, Suhr B, Buchheister A, Husstedt IW, Ringelstein EB. Sumatriptan and ergotamine overuse and drug-induced headache: a clinicoepidemiologic study. *Clin Neuropharmacol*. 1999;22:201-206.

42. Manack AN, Buse DC, Lipton RB. Chronic migraine: epidemiology and disease burden. *Curr Pain Headache Rep.* 2011;15:70-78.
43. Jennum P, Sjol A. Epidemiology of snoring and obstructive sleep apnoea in a Danish population, age 30-60. *J Sleep Res.* 1992;1:240-244.
44. Scher AI, Lipton RB, Stewart WF. Habitual snoring as a risk factor for chronic daily headache. *Neurology.* 2003;60:1366-1368.
45. Brennan KC, Charles A. Sleep and headache. *Semin Neurol.* 2009;29:406-418.
46. Scher AI, Stewart WF, Lipton RB. Caffeine as a risk factor for chronic daily headache: a population-based study. *Neurology.* 2004;63:2022-2027.
47. Burstein R, Cutrer MF, Yarnitsky D. The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain.* 2000;123:1703-1709.
48. Lipton RB, Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Silberstein S, Reed ML, Serrano D, Stewart WF; American Migraine Prevalence Prevention Advisory Group. Cutaneous allodynia in the migraine population. *Ann Neurol.* 2008;63:148-158.
49. Mainero C, Zhang WT, Kumar A, Rosen BR, Sorensen AG. Mapping the spinal and supraspinal pathways of dynamic mechanical allodynia in the human trigeminal system using cardiac-gated fMRI. *Neuroimage.* 2007;35:1201-1210.
50. Scher AI, Midgette LA, Lipton RB. Risk factors for headache chronification. *Headache* 2008;48:16-25.
51. Isler H, Thomas Willis' two chapters on headache of 1672: first attempt to apply the "new science" to this topic. *Headache.* 1986;26:95-98.
52. Graham JR, Wolff HG. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch Neurol Psychiatry.* 1938;39:737-763.
53. Leao AA. Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 1944;7:359-390.

54. Moskowitz MA. Neurogenic versus vascular mechanism of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13:307-311.
55. Leira R, Noya M. Fisopatología de la migraña. *Rev Clin Esp.* 1995;195:16-19.
56. James MF, Smith JM, Boniface SJ, Huang CL, Leslie RA. Cortical spreading depression and migraine: new insights from imaging? *Trends Neurosci.* 2001;24:266-271.
57. Olesen J, Lauritzen M, Tfelt-Hansen P, Henriksen L, Larsen B. Spreading cerebral oligemia in classical and normal cerebral blood flow in common migraine. *Headache.* 1982;22:242-248
58. Cao Y, Welch KM, Aurora S, Vikingstand EM. Functional MRI-BOLD of visually triggered headache in patients with migraine. *Arch Neurol.* 1999;56:548-554.
59. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:4687-4692.
60. Milner PM. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1958;10:705.
61. Castillo J, Martínez F, Leira R, Prieto JM, Lema M, Noya M. Cambios en los aminoácidos excitatorios durante y entre las crisis de migraña. *Neurología.* 1994;9:42-45.
62. Martínez F, Castillo J, Rodríguez JR, Leira R, Noya M. Neuroexcitatory amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid during migraine attacks. *Cephalalgia.* 1993;13:89-93.
63. van den Maagdenberg AM, Haan J, Terwindt GM, Ferrari MD. Migraine: gene mutations and functional consequences. *Curr Opin Neurol.* 2007;20:299-305.
64. Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain.* 1994;117:199-210.

65. Moskowitz MA, Bolay H, Dalkara T. Deciphering migraine mechanism: clues from familial hemiplegic migraine genotypes. *Ann Neurol*. 2004;55:276-280.
66. Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Parsons AA. The dynamics of nitric oxide release measured directly and in real time following repeated waves of cortical spreading depression in the anaesthetised cat. *Neurosci Lett*. 1997;232:127-130.
67. Obrenovitch TP, Urenjak J, Wang M. Nitric oxide formation during cortical spreading depression is critical for rapid subsequent recovery of ionic homeostasis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:680-688.
68. Geraud G, Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Cholet F. Positron emission tomographic studies of migraine. *RevNeurol (Paris)*. 2005;161:666-670.
69. Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med*. 1995;1:658-660.
70. Matharu MS, Cohen AS, McGonigle DJ, Ward N, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Posterior hypothalamic and brainstem activation in hemicrania continua. *Headache*. 2004;44:747-761.
71. Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet*. 2001;357:1016-1017.
72. Afridi SK, Matharu MS, Lee L, Kaube H, Friston KJ, Frackowiak RS, Goadsby PJ. A PET study exploring the laterality of brainstem activation in migraine using glyceryl trinitrate. *Brain*. 2005;128:932-939.
73. Matharu MS, Bartsch T, Ward N, Frackowiak RS, Weiner R, Goadsby PJ. Central neuromodulation in chronic migraine patients with suboccipital stimulators: a PET study. *Brain*. 2004;127:220-230.
74. Bovenot G, MacKenzie ET, Edvinsson L. Serotonergic innervation of the cerebral vasculature: relevance to migraine and ischaemia. *Brain Res Brain Res Rev*. 1991;16:257-263.
75. Rebeck GW, Marynard KI, Hyman BT, Moskowitz MA. Selective 5-HT<sub>1D</sub> alpha serotonin receptor gene expression in trigeminal ganglia:

- implications for antimigraine drug development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:3666-3669.
76. Leira R, Castillo J, Martínez F, Castro A, Lema M, Noya M. Plaquetas y migraña. Correlación entre marcadores moleculares de agregación plaquetaria y serotonina. *Neurología*. 1991;6:10-12.
  77. Quirion R, Van Rossum D, Dumont Y, St-Pierre S, Fournier A. Characterization of CGRP1 and CGRP2 receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;657:88-105.
  78. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev*. 1996;17:533-585.
  79. Edvinsson L. Blockade of CGRP receptors in the intracranial vasculature: a new target in the treatment headache. *Cephalalgia*. 2004;24:611-622.
  80. Williamson DJ, Hargreaves RJ. Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc Res Tech*. 2001;53:167-178.
  81. Conner AC, Simms J, Barwell J, Weathly M, Poyner DR. Ligand binding and activation of the CGRP receptor. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:729-732.
  82. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;54:233-246.
  83. Struthers AD, Brown MJ, Macdonald DW, Beachan JL, Stevenson JC, Morris HR, MacIntyre I. Human calcitonin gene related peptide: a potent endogenous vasodilator in man. *Clin Sci (Lond)*. 1986;70:389-393.
  84. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:6155-6160.
  85. Bigal ME, Serrano D, Buse D, Scher A, Stewart WF, Lipton RB. Acute migraine medications and evolution from episodic to chronic migraine: A longitudinal population-based study. *Headache*. 2008;48:1157-1168.

86. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;313:54-56.
87. Kawasaki H, Nuki C, Saito A, Takasaki K. Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;252:403-409.
88. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*. 2002;22:54-61.
89. Jushasz G, Zsombok T, Modos EA, Olajos S, Jakab B, Nemeth J, Szolcsanyi J, Vitrai J, Bagdy G. NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain*. 2003;106:461-470.
90. Kruuse C, Iversen HK, Jansen-Olesen I, Edvinsson L, Olesen J. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels during glyceryl trinitrate (GNT)-induced headache in healthy volunteers. *Cephalalgia*. 2010;30:467-474.
91. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*. 1990;28:183-187.
92. Sarchielli P, Pini LA, Zanchin G, Alberti A, Maggioni F, Rossi C, Floridi A, Calabresi P. Clinical-biochemical correlates of migraine attacks in rizatriptan responders and non-responders. *Cephalalgia*. 2006;26:257-265.
93. Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, Iversen HK, Schiffter S, Olesen J. No increase of calcitonin-gene related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol*. 2005;58:561-568.
94. Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G, Trequattrini A, Palumbo R. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia*. 1995;15:384-390.
95. Rodríguez-Osorio X, Sobrino T, Brea D, Martínez F, Castillo J, Leira R. Endothelial progenitor cells: a new key for endothelial dysfunction in migraine. *Neurology*. 2012;79:474-479.

96. Fusayasu E, Kowa H, Takeshima T, Nakaso K, Nakashima K. Increased plasma substance P and CGRP levels, and high ACE activity in migraineurs during headache-free periods. *Pain*. 2007;128:209-214.
97. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Olesen J. Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain*. 2000;86:133-138.
98. Cady RK, Vause CV, Ho TW, Bigal ME, Durham PL. Elevated saliva calcitonin gene-related peptide levels during acute migraine predict therapeutic response to rizatriptan. *Headache*. 2009;49:1258-1266.
99. Jang MU, Park JW, Kho HS, Chung SC, Chung JW. Plasma and saliva levels of nerve growth factor and neuropeptides in chronic migraine patients. *Oral Dis*. 2011;17:187-193.
100. Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Camblor P, Pascual J. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology*. 2013;8:1191-1196.
101. Tfelt-Hansen P, De Vries P, Saxena PR. Triptans in migraine: a comparative review of pharmacology, pharmacokinetics and efficacy. *Drugs*. 2000;60:1259-1287.
102. Smith D, Hill RG, Edvinsson L, Longmore J. An immunocytochemical investigation of human trigeminal nucleus caudalis: CGRP, substance P and 5-HT<sub>1D</sub>-receptor immunoreactivities are expressed by trigeminal sensory fibres. *Cephalalgia*. 2002;22:424-431.
103. Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Eng J Med*. 2004;350:1104-1110.
104. Tepper SJ, Cleves C. Telcagepant, a calcitonin gene-related peptide antagonist for the treatment of migraine. *Curr Opin Invest Drugs*. 2009;10:711-720.
105. Durham PL, Niemann C, Cardy R. Repression of stimulated calcitonin gene-related peptide secretion by topiramate. *Headache*. 2006;46:1291-1295.

106. Cernuda-Morollón E, Ramón C, Martínez-Camblor P, Serrano-Pertierra E, Larrosa D, Pascual J. OnabotulinumtoxinA decreases interictal CGRP plasma levels in patients with chronic migraine. *Pain*. 2015;156:820-824.
107. Peroutka SJ. Neurogenic inflammation and migraine: implications for the therapeutics. *Mol Interv*. 2005;5:304-311.
108. Brändli P, Löffler BM, Breu V, Osterwalder R, Maire JP, Clozel M. Role of endothelin in mediating neurogenic plasma extravasation in rat dura mater. *Pain*. 1996;64:315-322.
109. Messlinger K, Fischer MJ, Lennerz JK. Neuropeptide effects in the trigeminal system: pathophysiology and clinical relevance in migraine. *Keio J Med*. 2011;60:82-89.
110. Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, Fahrenkrug J, Olesen J, Ashina M. Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine. *Cephalgia*. 2008;28:226-236.
111. Goadsby PJ. Pathophysiology of migraine. *Neurol Clin*. 2009;27:335-360.
112. Goadsby PJ, MacDonald GJ. Extracranial vasodilation mediated by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Brain Res*. 1985;329:285-288.
113. Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Alvarez R, Larrosa D, Ramón C, Pascual J. Increased VIP levels in peripheral blood outside migraine attacks as a potential biomarker of cranial parasympathetic activation in chronic migraine. *Cephalgia*. 2015;35:310-316.
114. McDonald DM, Thurston G, Baluk P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation*. 1999;6:7-22.
115. Laird JM, Olivar T, Roza C, De Felipe C, Hunt SP, Cervero F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *Neuroscience*. 2000;98:345-352.
116. Diener HC. RPR100893, a substance-P antagonist, is not effective in the treatment of migraine attacks. *Cephalgia*. 2003;23:183-185.
117. Goldstein DJ, Wang O, Saper JR, Stoltz R, Silberstein SD, Mathew NT. Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: a crossover study. *Cephalgia*. 1997;17:785-790.

118. Tietjen GE, Khubchandani J. Vascular biomarkers in migraine. *Cephalalgia*. 2015;35:95-117.
119. Peterlin BL, Tietjen GE, Gower BA, Ward TN, Tepper SJ, White LW, Dash PD, Hammond ER, Haythornthwaite JA. *Headache*. 2013;53:474-490.
120. Perini F, D'Andrea G, Galloni E, Pignatelli F, Billo G, Alba S, Bussone G, Toso V. Plasma cytokine levels in migraineurs and controls. *Headache*. 2005;45:926-931.
121. Fidan I, Yüksel S, Ymir T, Irkeç C, Aksakal FN. The importance of cytokines, chemokines and nitric oxide in pathophysiology of migraine. *J Neuroimmunol*. 2006;171:184-188.
122. Uzar E, Evliyaoglu O, Yucel Y, Ugur Cevik M, Acar A, Guzel I, Islamoglu Y, Colpan L, Tasdemir N. Serum cytokine and pro-brain natriuretic peptide (BNP) levels in patients with migraine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15:1111-1116.
123. Gergont A, Kacinski M, Kwinta P. Proinflammatory cytokines in children with idiopathic headache. *Przegl Lek*. 2005;62:1269-1275.
124. Sarchielli P, Alberti A, Baldi A, Coppola F, Rossi C, Pierguidi L, Floridi A, Calabresi P. Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally. *Headache*. 2006;46:200-207.
125. Koçer A, Koçer E, Memişoğullari R, Domaç FM, Yüksel H. Interleukin-6 levels in tension headache patients. *Clin J Pain*. 2010;26:690-693.
126. Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract*. 2010;10:167-184.
127. Munno I, Marinaro M, Bassi A, Cassiano MA, Causarano V, Centonze V. Immunological aspects in migraine: Increase of IL-10 plasma levels during attack. *Headache*. 2001;41:764-767.
128. Mortensen RF. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunol Res*. 2001;24:163-176.
129. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med*. 2000;32:274-278.

130. Vermeire S, Van Assche G and Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:661-665.
131. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-843.
132. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003;107:499-511.
133. Di Napoli M, Papa F and Bocola V. C-reactive protein in ischemic stroke: An independent prognostic factor. *Stroke.* 2001;32:917-924.
134. Vanmolkot FH, de Hoon JN. Increased C-reactive protein in young adult patients with migraine. *Cephalalgia.* 2007;27:843-846.
135. Tietjen GE, Herial NA, White L, Utley C, Kosmyna JM, Khuder SA. Migraine and biomarkers of endothelial activation in young women. *Stroke.* 2009;40:2977-2982.
136. Güzel I, Tasdemir N, Celik Y. Evaluation of serum transforming growth factor  $\beta$ 1 and C-reactive protein levels in migraine patients. *Neurol Neurochir Pol.* 2013;47:357-362.
137. Hamed SA, Hamed EA, Ezz Eldin AM, Mahmoud NM. Vascular risk factors, endothelial function, and carotid thickness in patients with migraine: relationship to atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2010;19:92-103.
138. Tietjen GE, Khubchandani J, Herial N, Shah K. Adverse childhood experiences are associated with migraine and vascular biomarkers. *Headache.* 2012;52:920-929.
139. Nelson KB, Richardson AK, He J, Lateef TM, Khoromi S, Merikangas KR. Headache and biomarkers of vascular disease in a representative sample of US children. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2010;164:358-362.

140. Kurth T, Ridker P, Buring JE. Migraine and biomarkers of cardiovascular disease in women. *Cephalalgia*. 2008;28:49-56.
141. Guldiken S, Guldiken B, Demir M, et al. Soluble CD40 ligand and prolactin levels in migraine patients during interictal period. *J Headache Pain* 2011; 12:355-360.
142. Guldiken B, Guldiken S, Demir M, Turgut N, Kabayel L, Ozkan H, Ozcelik E, Tugrul A. Insulin resistance and high sensitivity C-reactive protein in migraine. *Can J Neurol Sci*. 2008;35:448-451.
143. Gudmundsson LS, Aspelund T, Scher AI, Thorgeirsson G, Johannsson M, Launer LJ, Gudnason V. C-reactive protein in migraine sufferers similar to that of nonmigraineurs: The Reykjavik study. *Cephalalgia*. 2009;29:1301-1310.
144. Chesterman CN. Vascular endothelium, haemostasis and thrombosis. *Blood Rev*. 1988;2:88-94.
145. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108:2054-2059.
146. Maseri A. Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events—exploring the hidden side of the moon. *N Engl J Med*. 1997;336:1014-1016
147. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;39:287-324.
148. Libby P, Aikawa M, Jain MK. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;176:285-306.
149. Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Leira R, Castillo J. Platelets, inflammation, and atherothrombotic neurovascular disease: the role of endothelial dysfunction. *Cerebrovasc Dis*. 2005; 20(Suppl 2):S32-S9.
150. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res*. 2009;335:143-151.
151. Markiewicz M, Richard E, Marks N, Ludwicka-Bradley A. Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular diseases. *J Aging Res*. 2013;2013:1-11.

152. Liman T, Bachelier-Walenta K, Neeb L, Rosinski J, Reuter U, Böhm M, Endres M. Circulating endothelial microparticles in female migraineurs with aura. *Cephalalgia*. 2015;35:88-94.
153. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev*. 2010;6:82-90.
154. Guldiken B, Demir M, Guldiken S, Turgut N, Ozkan H, Kabayel L, Tugrul A. Asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in migraine during the interictal period. *J Clin Neurosci*. 2009;16:672-674.
155. Uzar E, Evliyaoglu O, Toprak G, Acar A, Yucel Y, Calisir T, Cevik MU, Tasdemir N. Increased asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in patients with migraine. *J Headache Pain*. 2011;12:239-243.
156. Hamed SA, Hamed EA, Ezz Eldin AM, Mahmoud NM. Vascular risk factors, endothelial function, and carotid thickness in patients with migraine: Relationship to atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2010;19:92-103.
157. Bianchi A, Pitari G, Amenta V, Giuliano F, Gallina M, Costa R, Ferlito S. Endothelial, haemostatic and haemorheological modifications in migraineurs. *Artery*. 1996;22:93-100.
158. Gallai V, Sarchielli P, Firenze C, Trequattrini A, Paciaroni M, Usai F, Palumbo R. Endothelin-1 in migraine and tension-type headache. *Acta Neurol Scand*. 1994;89:47-55.
159. Komatsumoto S, Nara M. Lower level of endothelin-1 in migraine with aura. *Rinsho Shinkeigaku*. 1995;35:1250-1252.
160. Hasselblatt M, Köhler J, Volles E, Ehrenreich H. Simultaneous monitoring of endothelin-1 and vasopressin plasma levels in migraine. *Neuroreport*. 1999;10:423-425.
161. Kallela M, Färkkilä M, Saijonmaa O, Fyhrquist F. Endothelin in migraine patients. *Cephalalgia*. 1998;18:329-332.
162. Färkkilä M, Palo J, Saijonmaa O, Fyhrquist F. Raised plasma endothelin during migraine attack. *Cephalalgia*. 1992;12:383-384.

163. Nattero G, Mengozzi G, Inconis T, Paradisi L. Nitric oxide, endothelin-1, and transcranial Doppler in migraine. Findings in interictal conditions and during migraine attack. *Headache*. 1996;36:307-311.
164. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, Krejsek J. Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:1-10.
165. Meier P. Plasma sTWEAK and PTX3: New determinant tools of cardiovascular outcome also in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:697-699.
166. Yasunaga T, Ikeda S, Koga S, Nakata T, Yoshida T, Masuda N, Kohno S, Maemura K. Plasma pentraxin 3 is a more potent predictor of endothelial dysfunction than high-sensitive C-reactive protein. *Int Heart J*. 2014;55:160-164.
167. Morishita T, Uzui H, Nakano A, Mitsuke Y, Geshi T, Ueda T, Lee JD. Number of endothelial progenitor cells in peripheral artery disease as a marker of severity and association with pentraxin-3, malondialdehyde-modified low-density lipoprotein and membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19:149-158.
168. Shindo A, Tanemura H, Yata K, Hamada K, Shibata M, Umeda Y, Asakura F, Toma N, Sakaida H, Fujisawa T, Taki W, Tomimoto H. Inflammatory biomarkers in atherosclerosis: pentraxin 3 can become a novel marker of plaque vulnerability. *PLoS One*. 2014;9:1-8.
169. Díaz-López A, Bulló M, Chacón MR, Estruch R, Vendrell J, Díez-Espino J, Fitó M, Corella D, Salas-Salvadó J. Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:51.
170. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:411-425.
171. Yepes M. TWEAK and Fn14 in the Neurovascular Unit. *Front Immunol*. 2013;4:1-13.

172. Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K, Jakubowski A, Zheng TS. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine*. 2007;40:1-16.
173. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Orbe J, Páramo JA, Michel JB, Ortiz A, Meilhac O, Egido J. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:916-922.
174. Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med*. 2006;24:379-388
175. Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim DH, Kim EH, Choe VN, Kim JH, Im WS, Kang L, Park JE, Park HJ, Park HK, Song EC, Lee SK, Kim M, Roh JK. Decreased number and function of endothelial progenitor cells in patients with migraine. *Neurology*. 2008;70:1510-1517.
176. Oterino A, Toriello M, Palacio E, Quintanilla VG, Ruiz-Lavilla N, Montes S, Vega MS, Martínez-Nieto R, Castillo J, Pascual J. Analysis of endothelial precursor cells in chronic migraine: a case-control study. *Cephalalgia*. 2013;33:236-244.
177. Schretzenmayer A. Über Kreislaufregulatorische Vorgänge und den grossen arterien bei der muskellarbeit. *Pflugers Arch*. 1933;232:S743-S748.
178. Santos-García D, Blanco M, Serena J, Rodríguez-Yáñez M, Leira R, Castillo J. Impaired brachial flow-mediated dilation is a predictor of a new-onset vascular event after stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2011;32:155-162.
179. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-1319.
180. Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on signaling mechanisms controlling nitric oxide production, endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endothelium*. 2005;12:21-39.

181. Jin ZG, Wong C, Wu J, Berk BC. Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280:12305-12309.
182. Kooijman M, Thijssen DH, de Groot PC, Bleeker MW, van Kuppevelt HJ, Green DJ, Rongen GA, Smits P, Hopman MT. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. *J Physiol.* 2008;586:1137-1145.
183. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol.* 1995;268:1397-1404.
184. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-265.
185. Deanfield J1, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* 2005;23:7-17.
186. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Lüscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working

- Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005;23:233-46.
187. Santos-García D, Blanco M, Serena J, Arias S, Millán M, Rodríguez-Yáñez M, Leira R, Dávalos A, Castillo J. Brachial arterial flow-mediated dilation in acute ischemic stroke. *Eur J Neurol*. 2009;16:684-690.
188. Brevetti G, Silvestro A, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index. *Circulation*. 2003;108:2093-2098.
189. Chan SY, Mancini GB, Kuramoto L, Schulzer M, Frohlich J, Ignaszewski A. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1037-1043.
190. Patti G, Pasceri V, Melfi R, Goffredo C, Chello M, D'Ambrosio A, Montesanti R, Di Sciascio G. Impaired flow-mediated dilation and risk of restenosis in patients undergoing coronary stent implantation. *Circulation*. 2005;111:70-75.
191. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002;105:1567-1572.
192. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120:502-509.
193. Pretnar-Oblak J, Sabovic M, Pogacnik T, Sebestjen M, Zaletel M. Flow-mediated dilatation and intima-media thickness in patients with lacunar infarctions. *Acta Neurol Scand*. 2006;113:273-277.
194. Kim JS, Lee HS, Park HY, Kim SS, Kang HG, Kim NH, Park JS, Kim Y. Endothelial function in lacunar infarction: a comparison of lacunar

- infarction, cerebral atherosclerosis and control group. *Cerebrovasc Dis.* 2009;28:166-170.
195. Chen PL, Wang PY, Sheu WH, Chen YT, Ho YP, Hu HH, Hsu HY. Changes of brachial flow-mediated vasodilation in different ischemic stroke subtypes. *Neurology.* 2006;67:1056-1058.
196. Shutov AA, Baidina TV, Agafonov AV, Siutkina OV, Gaidash GV. Endothelial dysfunction in patients with ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2005;14:42-45.
197. Etminan M, Takkouche B, Isorna FC, Samii A. Risk of ischaemic stroke in people with migraine: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* 2005;330:63.
198. Schürks M, Rist PM, Bigal ME, Buring JE, Lipton RB, Kurth T. Migraine and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2009;339:b3914.
199. Spector JT, Kahn SR, Jones MR, Jayakumar M, Dalal D, Nazarian S. Migraine headache and ischemic stroke risk: an updated meta-analysis. *Am J Med.* 2010;123:612-624.
200. Bashir A, Lipton RB, Ashina S, Ashina M. Migraine and structural changes in the brain: a systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 2013;81:1260-1268.
201. Kurth T, Gaziano JM, Cook NR, Logroscino G, Diener HC, Buring JE. Migraine and risk of cardiovascular disease in women. *JAMA.* 2006;296:283-291.
202. Vanmolkot FH, Van Bortel LM, de Hoon JN. Altered arterial function in migraine of recent onset. *Neurology.* 2007;68:1563-1570.
203. Perko D, Pretnar-Oblak J, Sabovic M, Zvan B, Zaletel M. Endothelium-dependent vasodilatation in migraine patients. *Cephalalgia.* 2011;31:654-660.
204. Silva FA, Rueda-Clausen CF, Silva SY, Zarruk JG, Guzmán JC, Morillo CA, Vesga B, Pradilla G, Flórez M, López-Jaramillo P. Endothelial function in patients with migraine during the interictal period. *Headache.* 2007;47:45-51.

205. Vernieri F, Moro L, Altamura C, Palazzo P, Antonelli Incalzi R, Rossini PM, Pedone C. Patients with migraine with aura have increased flow mediated dilation. *BMC Neurol.* 2010;10:18.
206. Imamura K, Takeshima T, Fusayusu E, Nakashima K. Increased plasma matrix metalloproteinase-9 levels in migraine. *Headache* 2008;48:135-139.
207. Leira R, Sobrino T, Rodríguez-Yáñez M, Blanco M, Arias S, Castillo J. MMP-9 immunoreactivity in acute migraine. *Headache* 2007;457:698-702.
208. Hynes RO. Fibronectins. *Sci Am.* 1986;254:42-51.
209. Peters JH, Sporn LA, Ginsberg MH, Wagner DD. Human endothelial cells synthesize, process, and secrete fibronectin molecules bearing an alternatively spliced type III homology (ED1). *Blood.* 1990;75:1801-1808.
210. Peters JH, Maunder RJ, Woolf AD, Cochrane GH, Ginsberg MH. Elevated plasma levels of ED1+ ("cellular") fibronectin in patients with vascular injury. *J Lab Clin Med.* 1989;113:586-597.
211. Castellanos M, Sobrino T, Millán M, García M, Arenillas J, Nombela F, Brea D, Perez De La Ossa N, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Dávalos A. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. A multicenter confirmatory study. *Stroke.* 2007;38:1855-1859.
212. Copin JC, Rebetez MM, Turck N, Robin X, Sanchez JC, Schaller K, Gasche Y, Walder B. Matrix metalloproteinase 9 and cellular fibronectin plasma concentrations are predictors of the composite endpoint of length of stay and death in the intensive care unit after severe traumatic brain injury. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012;20:1-9.
213. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:1008-1022.
214. Gerlach R, Demel G, König HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, Seifert V, Kögel D. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience.* 2006;141:1697-1701.

215. Wiesmann M, Missler U, Gottman D, Gehring S. Plasma S-100b protein concentration in healthy adults is age and sex independent. *Clin Chem.* 1998;44:1056-1058.
216. Thalakoti S, Patil VV, Damodaram S, Vause CV, Langford LE, Freeman SE, Durham PL. Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. *Headache.* 2007;47:1008-1023.
217. Papandreou O, Soldatou A, Tsitsika A, Kariyannis C, Papandreou T, Zachariadi A, Papassotiriou I, Chrousos GP. Serum S100beta protein in children with acute recurrent headache: a potentially useful marker for migraine. *Headache.* 2005;45:1313-1316.
218. Teepker M, Munk K, Mylius V, Haag A, Möller JC, Oertel WH, Schepelmann K. Serum concentrations of s100b and NSE in migraine. *Headache.* 2009;49:245-252.
219. Yilmaz N, Karaali K, Ozdem S, Turkey M, Unal A, Dora B. Elevated S100B and neuron specific enolase levels in patients with migraine-without aura: evidence for neurodegeneration?. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31:579-585.
220. Celikbilek A, Sabah S, Tanik N, Ak H, Atalay T, Yilmaz N. Is serum S100B protein an useful biomarker in migraine?. *Neurol Sci.* 2014;35:1197-1201.
221. Cooper EH. Neuron-specific enolase. *Int J Biol Markers.* 1995;4:205-210.
222. Ingebrigtsen T, Romner B. Biochemical serum markers of traumatic brain injury. *J Trauma.* 2002;52:798-808.
223. Johnsson P. Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1996;10:120-126.
224. Persson L, Hårdemark HG, Gustafsson J, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pählman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke.* 1987;18:911-918.
225. Raabe A, Grolms C, Keller M, Dohnert J, Sorge O, Seifert V. Correlation of computed tomography findings and serum brain damage markers following severe head injury. *Acta Neurochir.* 1998;140:787-791.

226. Colombo B, Dalla Libera D, Comi G. Brain white matter lesions in migraine: what's the meaning?. *Neurol Sci.* 2011;32:S37-S40.
227. Fazekas F, Kleinert R, Offenbacher H, Schmidt R, Kleinert G, Payer F, Radner H, Lechner H. Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology.* 1993;43:1683-1689.
228. Xiong YY, Mok V. Age-related white matter changes. *J Aging Res.* 2011;2011:1-13.
229. Vuorinen M, Solomon A, Rovio S, Nieminen L, Kåreholt I, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Changes in vascular risk factors from midlife to late life and white matter lesions: a 20-year follow-up study. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2011;31:119-125.
230. Hyttinen L, Autti T, Rauma S, Soljanlahti S, Vuorio AF, Strandberg TE. White matter hyperintensities on T2-weighted MRI images among DNA-verified older familial hypercholesterolemia patients. *Acta Radiol.* 2009;50:320-326.
231. Cohen JI, Cazettes F, Convit A. Abnormal cholesterol is associated with prefrontal white matter abnormalities among obese adults, a diffusion tensor imaging study. *Neuroradiol J.* 2011;1:989-997.
232. Knopman DS, Penman AD, Catellier DJ, Coker LH, Shibata DK, Sharrett AR, Mosley TH Jr. Vascular risk factors and longitudinal changes on brain MRI: the ARIC study. *Neurology.* 2011;76:1879-1885.
233. Soges LJ, Cacayorin ED, Petro GR. Migraine: evaluation by MR. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1988; 9:425-429.
234. Igarashi H, Sakai F, Kan S, Okada J, Takazi Y. Magnetic resonance imaging of the brain in patients with migraine. *Cephalalgia.* 1991;11:69-74.
235. Pavese N, Canapicchi R, Nuti A, Bibbiani F, Lucetti C, Collavoli P, Bonuccelli U. White matter MRI hyperintensities in a hundred and twenty-nine consecutive migraine patients. *Cephalalgia.* 1994;14:342-345.
236. Rossato G, Adami A, Thijs VN, Cerini R, Pozzi-Mucelli R, Mazzucco S, Anzola GP, Del Sette M, Dinia L, Meneghetti G, Zanferrari C; SAM study group. Cerebral distribution of white matter lesions in migraine with aura patients. *Cephalalgia.* 2010;30:855-859.

237. Kruit MC, van Buchem MA, Hofman PA, Bakkers JT, Terwindt GM, Ferrari MD, Launer LJ. Migraine as a risk factor for subclinical brain lesions. *JAMA*. 2004;291:427-434.
238. Kruit MC, Launer LJ, Ferrari MD, van Buchem MA. Infarcts in the posterior circulation territory in migraine: the population-based MRI CAMERA study. *Brain*. 2005;128:2068-2077.
239. Palm-Meinders IH, Koppen H, Terwindt GM, Launer LJ, Konishi J, Moonen JM, Bakkers JT, Hofman PA, van Lew B, Middelkoop HA, van Buchem MA, Ferrari MD, Kruit MC. Structural brain changes in migraine. *JAMA*. 2012;308:1889-1897.
240. Kurth T, Mohamed S, Maillard P, Zhu YC, Chabriat H, Mazoyer B, Boussier MG, Dufouil C, Tzourio C. Headache, migraine, and structural brain lesions and function: population based Epidemiology of Vascular Ageing-MRI study. *BMJ* 2011;342:c7357.
241. Hamedani AG, Rose KM, Peterlin BL, Mosley TH, Coker LH, Jack CR, Knopman DS, Alonso A, Gottesman RF. Migraine and white matter hyperintensities: the ARIC MRI study. *Neurology*. 2013;81:1308-1313.
242. Debette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010;341:c3666.
243. Van der Flier WM, Van Straaten EC, Barkhof F, Verdelho A, Madureira S, Pantoni L, Inzitari D, Erkinjuntti T, Crisby M, Waldemar G, Schmidt R, Fazekas F, Scheltens P. Small vessel disease and general cognitive function in nondisabled elderly: the LADIS study. *Stroke*. 2005;36:2116-2120.
244. Mok VC, Wong A, Lam WW, Fan YH, Tang WK, Kwok T, Hui AC, Wong KS. Cognitive impairment and functional outcome after stroke associated with small vessel disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75:560-566.
245. Baezner H, Blahak C, Poggesi A, Pantoni L, Inzitari D, Chabriat H, Erkinjuntti T, Fazekas F, Ferro JM, Langhorne P, O'Brien J, Scheltens P, Visser MC, Wahlund LO, Waldemar G, Wallin A, Hennerici MG, LADIS Study Group.

- Association of gait and balance disorders with age-related white matter changes: the LADIS study. *Neurology* . 2008;70:935-942.
246. Vattakatuchery JJ, Joy J. Hyperintensities on MRI. White matter and depression. *BMJ*. 2010;341:c4611.
247. Olesen PJ, Gustafson DR, Simoni M, Pantoni L, Ostling S, Guo X, Skoog I. Temporal lobe atrophy and white matter lesions are related to major depression over 5 years in the elderly. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:2638-2645.
248. Tadic SD, Griffiths D, Murrin A, Schaefer W, Aizenstein HJ, Resnick NM. Brain activity during bladder filling is related to white matter structural changes in older women with urinary incontinence. *Neuroimage*. 2010;51:1294-1302.
249. Kuchel GA, Moscufo N, Guttman CR, Zeevi N, Wakefield D, Schmidt J, Dubeau CE, Wolfson L. Localization of brain white matter hyperintensities and urinary incontinence in community-dwelling older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009;64:902-909.
250. Jefferson AL, Tate DF, Poppas A, Brickman AM, Paul RH, Gunstad J, Cohen RA. Lower cardiac output is associated with greater white matter hyperintensities in older adults with cardiovascular disease. *J Am Geriatr Soc*. 2007;55:1044-1048.
251. Shrestha I, Takahashi T, Nomura E, Ohtsuki T, Ohshita T, Ueno H, Kohriyama T, Matsumoto M. Association between central systolic blood pressure, white matter lesions in cerebral MRI and carotid atherosclerosis. *Hypertens Res*. 2009;32:869-874.
252. Trauninger A, Leél-Ossy E, Kamson DO, Pótó L, Aradi M, Kövér F, Imre M, Komáromy H, Erdélyi-Botor S, Patzkó A, Pfund Z. Risk factors of migraine-related brain white matter hyperintensities: an investigation of 186 patients. *J Headache Pain*. 2011;12:97-103.
253. Ueno Y, Shimada Y, Tanaka R, Miyamoto N, Tanaka Y, Hattori N, Urabe T. Patent foramen ovale with atrial septal aneurysm may contribute to white matter lesions in stroke patients. *Cerebrovasc Dis*. 2010;30:15-22.

254. Spence JD, Wong DG, Melendez LJ, Nichol PM, Brown JD. Increased prevalence of mitral valve prolapsed in patients with migraine. *Can Med Assoc J.* 1984;131:1457-1460.
255. Vermeer SE, Longstreth WT, Koudstaal PJ. Silent brain infarcts: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2007;6:611-619.
256. Vermeer SE, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Breteler MM. Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. *Stroke.* 2002;1:21-25.
257. Longstreth WT Jr, Bernick C, Manolio TA, Bryan N, Jungreis CA, Price TR. Lacunar infarcts defined by magnetic resonance imaging of 3660 elderly people: the Cardiovascular Health Study. *Arch Neurol.* 1998;55:1217-1225.
258. Goldstein LB, Adams R, Becker K, Furberg CD, Gorelick PB, Hademenos G, Hill M, Howard G, Howard VJ, Jacobs B, Levine SR, Mosca L, Sacco RL, Sherman DG, Wolf PA, del Zoppo GJ. Primary prevention of ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke.* 2001;32:280-299.
259. Scher AI, Gudmundsson LS, Sigurdsson S, Ghambaryan A, Aspelund T, Eiriksdottir G, van Buchem MA, Gudnason V, Launer LJ. Migraine headache in middle age and late-life brain infarcts. *JAMA.* 2009;301:2563-2570.
260. Hougaard A, Jensen BH, Amin FM, Rostrup E, Hoffmann MB, Ashina M. Cerebral Asymmetry of fMRI-BOLD Responses to Visual Stimulation. *PLoS One.* 2015;10:e0126477.
261. Perko D, Pretnar-Oblak J, Sabovic M, Zvan B, Zatelel M. Differences between cerebrovascular reactivity to L-arginine in the anterior and posterior cerebral circulation. *Cerebrovasc Dis.* 2011;31:358-364.
262. Perko D, Pretnar Oblak J, Sabovic M, Zvan B, Zatelel M. Cerebrovascular reactivity to L-arginine in the anterior and posterior cerebral circulation in migraine patients. *Acta Neurol Scand.* 2011;124:269-274.
263. Rist PM, Dufouil C, Glymour MM, Tzourio C, Kurth T. Migraine and cognitive decline in the population-based EVA study. *Cephalalgia.* 2011;31:1291-1300.

264. Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med.* 2003;348:1215-1222.
265. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 2001;18:685-716.
266. Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem.* 1958;3:41-51.
267. Dobson J. Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease. *FEBS Lett.* 2001;496:1-5.
268. Schenck JF, Zimmerman EA. High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker? *NMR Biomed.* 2004;17:433-445.
269. Vymazal J, Brooks RA, Patronas N, Hajek M, Bulte JW, Di Chiro G. Magnetic resonance imaging of brain iron in health and disease. *J Neurol Sci.* 1995;134(Suppl.):19-26.
270. Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Pirko I. Iron deposition and inflammation in multiple sclerosis. Which one comes first?. *BMC Neurosci.* 2011;12:60.
271. Williams R, Rohr AM, Wang W, Choi I, Lee P, Berman N, Lynch S, LeVine SM. Iron deposition is independent of cellular inflammation and vascular changes in a cerebral model of multiple sclerosis. *BMC Neurosci.* 2011;12:59.
272. Welch KM, Nagesh V, Aurora SK, Gelman N. Periaqueductal gray matter dysfunction in migraine: cause or the burden of illness? *Headache.* 2001;41:629-637.
273. Kruit MC, Launer LJ, Overbosch J, van Buchem MA, Ferrari MD. Iron accumulation in deep brain nuclei in migraine: a population-based magnetic resonance imaging study. *Cephalalgia.* 2009;29:351-359.
274. Kruit MC, van Buchem MA, Launer LJ, Terwindt GM, Ferrari MD. Migraine is associated with an increased risk of deep white matter lesions, subcortical

- posterior circulation infarcts and brain iron accumulation: The population-based MRI CAMERA study. *Cephalalgia*. 2010;30:129-136.
275. Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet*. 2001;357:1016-1017.
276. Afridi SK, Matharu MS, Lee L, Kaube H, Friston KJ, Frackowiak RS, Goadsby PJ. A PET study exploring the laterality of brainstem activation in migraine using glyceryl trinitrate. *Brain*. 2005;128:932-939.
277. Welch KM, Cao Y, Aurora S, Wiggling G, Vikingstad EM. MRI of the occipital cortex, red nucleus, and substantia nigra during visual aura of migraine. *Neurology*. 1998;51:1465-1469.
278. Iadarola MJ, Berman KF, Zeffiro TA, Byas-Smith MG, Gracely RH, Max B, Bennett GJ. Neural activation during acute capsaicin-evoked pain and allodynia assessed with PET. *Brain*. 1998;121:931-947.
279. Morris CM, Candy JM, Omar S, Bloxham CA, Edwardson JA. Transferrin receptors in the parkinsonian midbrain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994;20:468-472.
280. Tepper SJ, Lowe MJ, Beall E, Phillips MD, Liu K, Stillman MJ, Horvat M, Jones SE. Iron deposition in pain-regulatory nuclei in episodic migraine and in chronic daily headache by MRI. *Headache*. 2012;52:236-243.
281. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry: the methods. *Neuroimage*. 2000;11:805-821.
282. Eriksson SH, Free SL, Thom M, Symms MR, Martinian L, Duncan JS, Sisodiya SM. Quantitative grey matter histological measures do not correlate with grey matter probability values from in vivo MRI in the temporal lobe. *J Neurosci*. 2009;1:111-118.
283. Franklin TR, Wang Z, Shin J, Jagannathan K, Suh JJ, Detre JA, O'Brien CP, Childress AR. A VBM study demonstrating 'apparent' effects of a single dose of medication on T1-weighted MRIs. *Brain Struct Funct*. 2013;218:97-104.
284. Matharu MS, Good CD, May A, Bahra A, Goadsby PJ. No change in the structure of the brain in migraine: a voxel-based morphometric study. *Eur J Neurol*. 2003;10:53-57.

285. Schmitz N, Admiraal-Behloul F, Arkink EB, Kruit MC, Schoonman GG, Ferrari MD, van Buchem MA. Attack frequency and disease duration as indicators for brain damage in migraine. *Headache*. 2008;48:1044-1055.
286. Valfrè W, Rainero I, Bergui M, Pinessi L. Voxel-based morphometry reveals gray matter abnormalities in migraine. *Headache*. 2008;48:109-117.
287. Rocca MA, Ceccarelli A, Falini A, Colombo B, Tortorella P, Bernasconi L, Comi G, Scotti G, Filippi M. Brain gray matter changes in migraine patients with T2-visible lesions: a 3-T MRI study. *Stroke*. 2006;37:1765-1770.





