

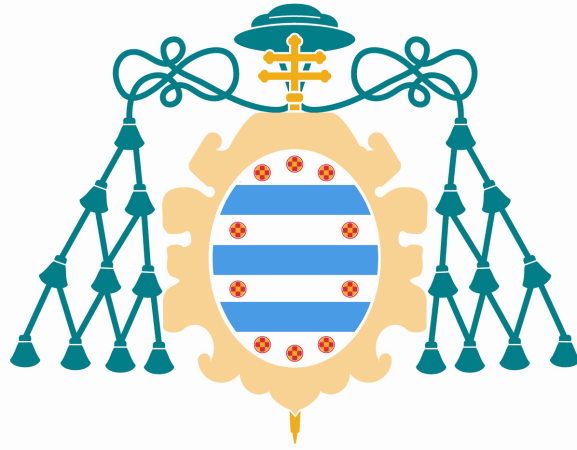
Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado  
CIENCIAS DE LA SALUD

**El péptido en relación con el gen de la calcitonina  
como potencial biomarcador de la migraña crónica**

Autor  
César Ramón Carbajo





Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado  
CIENCIAS DE LA SALUD

**El péptido en relación con el gen de la calcitonina  
como potencial biomarcador de la migraña crónica**

Autor  
César Ramón Carbajo









Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

### 1.- Título de la Tesis

Español/Otro Idioma: El péptido en relación con el gen de la calcitonina como potencial biomarcador de migraña crónica

Inglés: Calcitonin gene-related peptide as a potential biomarker for chronic migraine

### 2.- Autor

Nombre: CÉSAR RAMÓN CARBAJO

Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud.

Órgano responsable: Centro internacional de postgrado

## RESUMEN (en español)

### INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la migraña crónica (MC) es del 1-2%, de predominio en mujeres. Es una entidad con una fisiopatología compleja en la que intervienen distintas estructuras y circuitos nerviosos. La principal teoría fisiopatológica de la migraña se basa en la sensibilización de las vías centrales del dolor, mediada por la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en las terminales nerviosas como resultado de la activación del sistema trigémino-vascular.

### OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue determinar la validez de CGRP en sangre periférica como posible biomarcador de MC. Además pretendimos conocer la existencia de una posible relación entre estos niveles de CGRP y la respuesta clínica al tratamiento preventivo con onabotulinumtoxinA (onabotA) en pacientes con MC. Finalmente evaluamos la posible variación (y su magnitud) de los niveles de CGRP asociada a la eficacia del tratamiento con onabotA en pacientes con MC.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 2 poblaciones de pacientes. Una población estudio compuesta 103 mujeres con MC y otra población control compuesta por 43 con migraña episódica (ME), 14 pacientes con cefalea en racimos (CR) y 31 mujeres sin cefalea. Todos las



pacientes con migraña se ajustaban a los criterios de la Clasificación Internacional de Cefaleas. A todos los pacientes se les realizó una determinación de niveles de CGRP en sangre periférica en periodo interictal. Posteriormente, un subgrupo de pacientes con MC recibió tratamiento con onabotA (al menos 2 ciclos con una periodicidad trimestral) de acuerdo con las indicaciones del estudio PREEMPT. En este subgrupo de pacientes se procedió a la determinación interictal de niveles de CGRP en sangre periférica antes del inicio del tratamiento con onabotA y un mes después. Se compararon los niveles de CGRP entre los distintos grupos, entre aquellos con/sin respuesta clínica al tratamiento con onabotA así como antes/después del tratamiento con onabotA. El análisis de resultados se realizó mediante el test de Chi<sup>2</sup> para variables categóricas, test no paramétricos (Mann-Whitney, Wilcoxon pareado y no pareado y Kruskal-Wallis) para variables continuas y mediante curvas ROC-Índice de Youden para valorar la capacidad de discriminación de los niveles de CGRP.

## **RESULTADOS**

Durante el periodo interictal, los niveles de CGRP en sangre periférica de pacientes con MC ( $74,90 \pm 28,29$  pg/mL) fueron significativamente más elevados que en pacientes con ME, CR y controles sin cefalea. Estos hallazgos no se influenciaron por el tratamiento sintomático o preventivo, el abuso de analgésicos, la presencia de factores de riesgo vascular ni otras comorbilidades. Un nivel de CGRP en sangre periférica  $>43,45$  pg/mL permite clasificar correctamente a más del 90% de pacientes con MC. Las pacientes con MC y respuesta clínica favorable al tratamiento con onabotA, presentaban niveles de CGRP en sangre periférica significativamente más elevados que aquellas sin respuesta al tratamiento. Niveles de CGRP en sangre periférica  $>72$  pg/mL predijeron una buena respuesta a tratamiento con onabotA en MC. El descenso en los niveles de CGRP en sangre periférica en periodo interictal de aquellas pacientes con buena respuesta clínica al tratamiento con onabotA resultó significativamente mayor que entre aquellas no respondedoras al tratamiento.

## **CONCLUSIONES**

En pacientes con MC, los niveles interictales de CGRP en sangre periférica se encuentran elevados, siendo este incremento superior a la encontrada en pacientes con otro tipo de cefalea primaria o controles sin cefalea. Esta elevación permite identificar correctamente como MC a la gran mayoría de estos pacientes. Existe una relación directa entre los niveles de GCRP en sangre periférica de pacientes con MC previos al inicio del tratamiento con onabotA y la respuesta clínica al mismo. En pacientes con MC respondedores al tratamiento con onabotA se produce un descenso en los niveles de CGRP en sangre periférica proporcional a la mejoría clínica.



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

## RESUMEN (en Inglés)

### INTRODUCTION

The prevalence of chronic migraine (CM) is 1-2%, being much more frequent in women. It has a complex pathophysiology in which different nervous system structures and networks are involved. The main pathophysiological theory of migraine is based on central nociceptive pathways sensitization, mediated by the release of the peptide related to the calcitonin gene (CGRP) from nerve terminals, as a result of trigeminovascular system activation.

### OBJECTIVES

The objective of this study was to determine CGRP levels outside migraine attacks in peripheral blood as a potential CM biomarker. Additionally, we analysed the potential correlation between CGRP levels and clinical response to preventive treatment with onabotA in CM patients. Finally, we studied whether treatment with onabotA in CM is able to induce changes (and its magnitude) in interictal CGRP concentrations related with the treatment efficacy.

### MATERIAL AND METHODS

We selected two populations of participants. The study population comprised 103 women with CM and for the control groups, we recruited 43 patients with episodic migraine (EM), 14 patients with cluster headache (CH) and 31 healthy women without headache. All migraine patients fulfilled International Headache Classification criteria. All patients underwent a determination of CGRP levels in peripheral blood in the interictal period. Subsequently, a subgroup of CM patients were treated with onabotA at least twice over 2 consecutive periods 12 weeks apart following the PREEMPT protocol. In this subgroup of patients, CGRP levels were determined in peripheral blood samples obtained before and one month after treatment with onabotA. CGRP levels were compared between different groups, those with or without clinical response and those before and after onabotA treatment. Relationships among categorical variables were tested using the Chi-square test. Non-parametric test (Mann-Whitney, paired and unpaired Wilcoxon and Kruskal-Wallis) were used for continuous variables. The receiver operating characteristic curve and the area under ROC curve were obtained to measure discrimination capacity using the Youden index as threshold point.



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

## RESULTS

CGRP interictal levels in peripheral blood of CM patients ( $74.90 \pm 28.29$  pg /mL) were significantly higher as compared with control women, women with EM and patients with CH. These CGRP levels were not influenced by symptomatic or preventive treatment, analgesic abuse, the presence of vascular risk factors or other comorbidities. A peripheral blood CRGP concentration  $> 43.45$  pg/mL correctly classifies more than 90% of CM patients. Those patients with CM and responders to treatment with onabotA had significantly higher levels of peripheral blood CGRP than those without response to treatment. CGRP levels in peripheral blood  $> 72$  pg/mL predicted a good response to treatment with onabotA in CM. The decrease in CGRP levels in peripheral blood in the interictal period of responders to treatment with onabot was significantly greater than among those not responding to the treatment.

## CONCLUSIONS

In CM patients, interictal CGRP levels measured in peripheral blood outside migraine attacks are increased. This increase is higher than that found in patients with EM, CH or in controls without headache and correctly classifies most of CM patients. There is a direct relationship between GCRP levels in peripheral blood of CM patients prior to the start of treatment with onabotA and the clinical response to it. In CM patients responding to treatment with onabotA there is a decrease in CGRP levels in peripheral blood proportional to the clinical improvement.

FOR-MAT-VOA-010 (Reg.2018)

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN CIENCIAS DE LA SALUD

# ÍNDICE



|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>19</b> |
| <b>1. Definición y clasificación de la migraña</b>  | <b>21</b> |
| <b>2. Epidemiología de la migraña</b>   | <b>24</b> |
| <b>3. Fisiopatología de la migraña</b>  | <b>25</b> |
| 3.1. Teoría vascular  | 25        |
| 3.2. Inflamación neurógena  | 26        |
| 3.3. Teoría neuronal central  | 28        |
| 3.4. Depresión propagada cortical   | 28        |
| <b>4. Sistema trigémino-vascular</b>  | <b>31</b> |
| 4.1. Proyecciones aferentes periféricas   | 32        |
| 4.2. Ganglio trigeminal, de Gasser o semilunar  | 33        |
| 4.3. Proyecciones aferentes centrales   | 34        |
| 4.4. Proyecciones desde el tronco del encéfalo y tálamo a estructuras córtico-subcorticales | 35        |
| 4.5. Proyecciones moduladoras descendentes  | 38        |
| <b>5. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina</b>                                  | <b>40</b> |
| 5.1. Tipos de receptores de CGRP  | 40        |
| 5.2. Vías de señalización intracelular  | 41        |
| 5.3. Expresión de CGRP y sus receptores en regiones implicadas en la migraña                | 42        |
| <b>6. CGRP en migraña</b>   | <b>43</b> |
| 6.1. Relación de CGRP y migraña   | 43        |
| 6.1.1. Estudios observacionales   | 43        |
| 6.1.2. Estudios experimentales  | 45        |
| 6.2. Implicación fisiopatológica de CGRP en la migraña                                      | 45        |
| 6.2.1. Vasodilatación   | 45        |
| 6.2.2. Inflamación neurógena  | 46        |
| 6.2.3. Sensibilización  | 46        |
| a) Sensibilización periférica   | 47        |
| b) Sensibilización central  | 48        |
| 6.2.4. Fotofobia  | 48        |
| 6.2.5. Depresión propagada cortical   | 49        |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>7. Onabolulinumtoxin A</b>                                   | <b>50</b> |
| 7.1. Mecanismo de acción  | 50        |
| 7.2. OnabotA en el tratamiento de migraña crónica               | 51        |
| <br>  |           |
| <b>II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b>                            | <b>53</b> |
| <br>  |           |
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>                                  | <b>57</b> |
| <br>  |           |
| <b>1. Selección de la muestra</b>                               | <b>59</b> |
| 1.1. Pacientes  | 59        |
| 1.2. Controles  | 59        |
| <b>2. Criterios de inclusión</b>                                | <b>59</b> |
| <b>3. Criterios de exclusión</b>                                | <b>59</b> |
| <b>4. Protocolo del estudio</b>                                 | <b>60</b> |
| 4.1. Recogida de variables                                      | 60        |
| 4.2. Obtención de la muestra y procedimientos de laboratorio    | 60        |
| 4.3. Determinación de CGRP                                      | 61        |
| 4.4. Tratamiento con onabotA                                    | 61        |
| 4.5. Evaluación de respuesta al tratamiento con onabotA         | 62        |
| <b>5. Comité de ética</b>                                       | <b>63</b> |
| <b>6. Análisis estadístico</b>                                  | <b>63</b> |
| 6.1. Estadística descriptiva                                    | 63        |
| 6.2. Relación entre variables                                   | 63        |
| <br>  |           |
| <b>IV. RESULTADOS</b>   | <b>65</b> |
| <br>  |           |
| <b>1. Descripción de la muestra</b>                             | <b>67</b> |
| <b>2. Niveles de CGRP</b>                                       | <b>69</b> |
| 2.1. Determinación de niveles de CGRP en los distintos grupos   | 69        |
| 2.2. Comparación de niveles de CGRP entre los diferentes grupos | 69        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3. Comparación de niveles de CGRP entre pacientes con migraña crónica _____                       | 70        |
| <b>3. Niveles de CGRP como marcador de migraña _____</b>  | <b>75</b> |
| <b>4. CGRP y tratamiento con onabotA en migraña crónica _____</b>                                   | <b>76</b> |
| 4.1. Niveles de CGRP en pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con onabotA _____ | 77        |
| 4.2. Niveles de CGRP como predictor del grado de respuesta clínica a tratamiento con onabotA _____  | 80        |
| 4.3. Niveles de CGRP como predictor de respuesta a tratamiento con onabotA _____                    | 80        |
| 4.4. Variación de los niveles de CGRP en respuesta al tratamiento con onabotA _____                 | 81        |

## **V. DISCUSIÓN \_\_\_\_\_ 83**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. CGRP como biomarcador de migraña crónica _____</b>   | <b>87</b> |
| <b>2. CGRP como predictor de respuesta a tratamiento con onabotA _____</b>   | <b>92</b> |
| <b>3. Correlación entre la variación de los niveles de CGRP y respuesta clínica al tratamiento con onabotA _____</b> | <b>94</b> |
| <b>4. Limitaciones del estudio _____</b>   | <b>97</b> |

## **VI. CONCLUSIONES \_\_\_\_\_ 99**

## **VII. BILIOGRAFÍA \_\_\_\_\_ 103**

### **VIII. ANEXOS**

#### **Publicaciones**

- Cernuda E, Larrosa D, Ramón C et al. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology*. 2013; 81:1–6.
- Cernuda-Morollón E, Martínez-Cambor P, Ramón C et al. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of Onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache*. 2014; 54:987-95.
- Cernuda-Morollón E, Ramón C, Martínez-Cambor P et al. OnabotulinumtoxinA decreases interictal CGRP plasma levels in chronic migraine patients. *Pain*. 2015; 156:820-4.
- Ramón C, Cernuda-Morollón E, Pascual J. Calcitonin gene-related peptide in peripheral blood as a biomarker for migraine. *Curr Opin Neurol*. 2017; 30:281-6.



# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA MIGRAÑA.

En la actualidad las cefaleas se clasifican según las recomendaciones publicadas por el Comité de Clasificación de Cefaleas de la International Headache Society. En enero de 2018 se publicó la 3ª Edición de la Clasificación Internacional de las Cefaleas (ICHD-III)<sup>1</sup>.

Según la ICHD-III la migraña se subdivide en 2 tipos fundamentales:

### 1. Migraña sin aura (MO)

Descripción:

Episodios de cefalea recurrente de 4-72 horas de duración. Las características típicas de este dolor son la localización unilateral, el carácter pulsátil, la intensidad moderada-grave, el empeoramiento por la actividad física rutinaria y la asociación con náuseas y/o fotofobia y fonofobia.

Criterios diagnósticos:

- A. Al menos cinco crisis que cumplan los criterios B-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 cuatro características:
  - 1. Localización unilateral.
  - 2. Carácter pulsátil.
  - 3. Dolor de intensidad moderada o grave.
  - 4. Empeora por o condiciona el abandono de la actividad física habitual.
- D. Al menos uno de los siguientes síntomas durante la cefalea:
  - 1. Náuseas y/o vómitos.
  - 2. Fotofobia y fonofobia.
- E. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la ICHD-III.

### 2. Migraña con aura (MA)

Descripción:

Episodios recurrentes de minutos de duración, completamente reversibles, de síntomas visuales, sensitivos u otros del sistema nervioso central que habitualmente se presentan de manera consecutiva y suelen preceder a la aparición de la migraña.

Criterios diagnósticos:

- A. Al menos dos crisis que cumplan los criterios B y C.
- B. Uno o más de los siguientes síntomas de aura totalmente reversibles:
  - 1. Visuales.
  - 2. Sensitivos.
  - 3. De habla o del lenguaje.
  - 4. Motores.
  - 5. Tronco-encefálicos.
  - 6. Retinianos.
- C. Al menos tres de las siguientes seis características:
  - 1. Al menos uno de los síntomas de aura progresa gradualmente durante un período  $\geq 5$  minutos.
  - 2. Dos o más síntomas de aura se presentan en sucesión.
  - 3. Cada síntoma de aura individual tiene una duración de entre 5 y 60 minutos.
  - 4. Al menos uno de los síntomas de aura es unilateral.
  - 5. Al menos uno de los síntomas de aura es positivo.
  - 6. El aura se acompaña o se sigue, antes de 60 minutos, de cefalea.
- D. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la ICHD-III.

En función de la frecuencia de las crisis de dolor la migraña puede subclasificarse como:

1. Migraña crónica (MC)

Descripción:

Cefalea que ocurre quince o más días al mes durante un periodo de más de tres meses, y que al menos ocho de los quince días presenta características de migraña.

Criterios diagnósticos:

- A. Cefalea (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. Al menos cinco crisis que cumplan los criterios B-D de migraña sin aura y/o los criterios B y C de migraña con aura.
- C. Durante un período de 8 o más días al mes, por espacio de más de 3 meses, cumple

cualquiera de los siguientes:

1. Criterios C y D de migraña sin aura.
  2. Criterios B y C de migraña con aura.
  3. En el momento de la aparición el paciente cree que es migraña, y alivia con un triptán o derivados ergóticos.
- D. Sin mejor explicación por otro diagnóstico de la ICHD-III.

## 2. Migraña episódica (ME)

Cuando las crisis de migraña con o sin aura no cumplen criterios de cronicidad (<15 días al mes).



## **2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA MIGRAÑA.**

Numerosos estudios epidemiológicos han documentado la elevada prevalencia de la migraña y su enorme impacto socioeconómico y personal, convirtiéndola en una patología incapacitante. Conforme al estudio Global Burden of Disease Survey 2016, de entre las enfermedades neurológicas, es el trastorno más invalidante. Globalmente supone la séptima enfermedad más prevalente y la segunda en años de vida ajustados por discapacidad<sup>2</sup>. En los países occidentales la prevalencia de la migraña es de aproximadamente el 12%, con una mayor prevalencia en mujeres (mujeres 18% vs. varones 6%) y entre la segunda y cuarta décadas de la vida, llegando a identificarse hasta en el 24% de las mujeres con edades comprendidas entre los 30-39 años. Entre los subtipos de migraña, la MO es el más frecuente, representando aproximadamente el 75-80% de los casos<sup>3</sup>.

La prevalencia global de la MC es de aproximadamente del 1-2%. En la mayoría de los casos, la MC es el resultado del incremento progresivo de la frecuencia de los ataques de ME hasta su cronificación. Los mecanismos implicados en la cronificación de la migraña no se conocen con certeza, estimándose una tasa anual de transición desde ME hacia MC del 2,5-3%<sup>4,5</sup>. La MC se asocia con mayor discapacidad y deterioro de la calidad de vida que la ME, provocando una disminución de la productividad personal y laboral de cuatro a seis veces mayor que la ME<sup>4,5</sup>.

### **3. FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA.**

En la actualidad la migraña es considerada una entidad con una fisiopatología compleja, en la que intervienen distintas estructuras y circuitos nerviosos que no se conocen en su totalidad. Desde las primeras hipótesis formuladas en los años 40, han sido múltiples las teorías propuestas para explicar los mecanismos subyacentes en esta patología.

#### **3.1. Teoría vascular.**

Durante muchos años, la vasodilatación arterial ha sido considerada como la principal causa de migraña. Esta teoría se basa en la activación de las fibras nerviosas perivasculares como consecuencia de la vasodilatación.

El punto de partida de esta teoría se basa en las observaciones de Graham y Wolff. Estos autores describieron una estrecha relación entre los cambios de amplitud del pulso arterial en ramas de la arteria carótida externa (arteria temporal y occipital) y la intensidad de la cefalea. Comprobaron además cómo la exposición a factores que reducen la amplitud del pulso (como la inyección de tartrato de ergotamina) o que lo incrementan (como la histamina), disminuían o aumentaban la intensidad de la migraña, respectivamente<sup>6</sup>. Una observación posterior de Ray y Wolff, consistente en la aparición de cefalea de características migrañosas como resultado de la estimulación mecánica (distensión rítmica de las arterias), térmica o eléctrica tanto de arterias extracraneales (ramas superficiales de arteria carótida externa y segmento extracraneal de arteria carótida interna) como intracraneales (arterias meníngeas y las grandes arterias de la base del cerebro y sus ramas) extendió la hipótesis vascular extracraneal a la vasculatura intracraneal<sup>7</sup>. A favor de esta teoría se encuentran también la naturaleza púlsatil de la cefalea migrañosa y, más recientemente, la observación de que la administración de sustancias vasodilatadoras como óxido nítrico (ON) son capaces de desencadenar migrañas. Mientras, sustancias con efecto vasoconstrictor (como los ergóticos o los triptanes) resultan efectivas en el tratamiento de la migraña.

Sin embargo, la evidencia posterior rebate esta teoría. Por un lado, estudios clínicos han observado que los latidos experimentados durante la migraña no están sincronizados con el ritmo cardiaco<sup>8,9</sup>. Adicionalmente, estudios experimentales en pacientes migrañosos evidenciaron una marcada dilatación de las arterias intracraneales en respuesta a la infusión intravenosa de péptido intestinal

vasoactivo (VIP) (uno de los vasodilatadores más potentes conocidos) sin desencadenar clara cefalea migrañosa<sup>9</sup>. En otros estudios experimentales en animales, la administración de agentes vasoactivos no provocó la activación de los nociceptores perivasculares duros, sugiriendo que la vasodilatación dural per se no es nociceptiva<sup>11,12,13</sup>. Finalmente, estudios funcionales de angio-RM y flujo sanguíneo cerebral realizados durante crisis de migraña han demostrado resultados contradictorios:

- En la migraña con aura la relación entre dolor y flujo sanguíneo cerebral es variable, habiéndose descrito cefalea en relación con el aumento y con la disminución de flujo sanguíneo. Mientras, en las crisis de migraña sin aura, no se han descrito cambios en el flujo sanguíneo cerebral<sup>14,15,16</sup>.
- Los resultados observados en estudios de angio-RM también difieren en función de la naturaleza del episodio migrañoso (espontáneo vs provocado) y del agente empleado como desencadenante del mismo. Si bien en un estudio inicial, realizado con nitroglicerina como agente inductor de migraña, no mostró cambios en el flujo ni el diámetro de las arterias intra ni extracraneales<sup>17</sup>; estudios posteriores, realizados con CGRP y cilostazol como agentes inductores, mostraron la dilatación de arterias intracraneales, fundamentalmente de la arteria meníngea media<sup>18,19</sup>. Por otro lado, un estudio realizado durante un ataque espontáneo de migraña mostró la vasodilatación de la ACM bilateral y la ACI cavernosa ipsilateral al dolor<sup>20</sup>.

Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la vasodilatación no es necesaria ni suficiente para desencadenar la migraña, por lo que la migraña no puede considerarse como un "dolor de cabeza vascular".

### **3.2. Inflamación neurógena.**

Las lesiones tisulares con inflamación local son una de las principales fuentes de activación de nociceptores y dolor. Si bien la migraña no se acompaña de ninguna lesión tisular, la hipótesis inflamatoria, propuesta originalmente en los años 80, implica una inflamación meníngea como causa principal de la cefalea<sup>21</sup>. Esta teoría se basa en la demostración, en modelos animales, de que la inflamación meníngea neurógena consistente en vasodilatación, extravasación de proteínas plasmáticas y liberación de mediadores proinflamatorios por los mastocitos al espacio dural, produce una activación y sensibilización de nociceptores meníngeos<sup>22,23,24</sup>.

A favor de esta teoría se encuentra la capacidad de los antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos para aliviar la migraña<sup>25,26</sup>. Por otro lado, durante largo tiempo se ha especulado la implicación de las células mastoideas con la migraña. En los años 50 se demostró como la inyección en la circulación craneal de un agente promotor de degranulación de mastocitos daba lugar a cefalea<sup>27</sup>. Posteriormente se comprobó la eficacia en la prevención de la migraña de un agente estabilizador de mastocitos en un subgrupo de pacientes con migraña asociada con alergias alimentarias<sup>28</sup>. El papel de los mastocitos en la inflamación meníngea se apoya además en el hallazgo de una población considerable en la duramadre de animales y humanos, mayor aún en pacientes migrañosos<sup>29</sup>. Además se ha descrito un aumento de los niveles de mediadores inflamatorios en sangre de vena yugular interna (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), en sangre periférica (IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF $\alpha$ ) y en líquido cefalorraquídeo (TNF $\alpha$ ) durante los ataques de migraña<sup>30,31,32</sup>.

A pesar de que en estudios in vitro con tejido dural humano se ha demostrado que la sustancia P (SP) provoca la degranulación de los mastocitos duros<sup>33</sup>, en contra de esta teoría destaca que una gran cantidad de moléculas desarrolladas para bloquear esta degranulación (como los antagonistas de los receptores de SP) fracasaron como tratamientos agudos y preventivos de la migraña<sup>34,35</sup>. Así mismo, moléculas que inhiben la extravasación de proteínas han resultado ineficaces en el tratamiento de la migraña<sup>36</sup>. Las mediciones de citoquinas en sangre periférica durante los ataques de migraña, a pesar de varios informes positivos, generalmente han dado lugar a resultados no concluyentes<sup>37</sup>. Por otro lado, siendo la migraña una entidad crónica y recurrente, si existiera un sustrato inflamatorio como desencadenante de las mismas, es probable que obtuviéramos signos de patología inflamatoria a nivel de LCR o RM que no se han descrito hasta la fecha<sup>38</sup>.

El concepto de inflamación neurógena indudablemente tuvo un tremendo impacto en la investigación de la migraña y proporcionó una hoja de ruta importante para el desarrollo de terapias impulsadas por neuropéptidos y receptores para la migraña. Si bien la inflamación neurógena meníngea se sigue considerando como un factor causal en la migraña, la evidencia directa de la aparición de inflamación neurógena durante la migraña y su papel en la nocicepción meníngea es, en el mejor de los casos, limitada.

### **3.3. Teoría neuronal central.**

En las últimas décadas diferentes estudios sugieren que los pacientes migrañosos presentan una hiperexcitabilidad neuronal que les hace especialmente vulnerables a desencadenantes de migraña.

En favor de esta teoría, se encuentra que la mayoría de los síntomas asociados a la migraña parecen originarse en el sistema nervioso central. Por ejemplo, en la fase premonitoria aparecen alteraciones cognitivas y cambios de humor o irritabilidad, en la fase de aura ocurren alteraciones visuales, parestesias o alteraciones del lenguaje y en la fase de dolor se presenta foto y/o fonofobia<sup>39,40</sup>. Adicionalmente, los avances en la genética molecular han permitido la identificación de varios genes asociados con la migraña hemipléjica familiar. Estos genes (CACNA1A, ATP1A2 y SCN1A) codifican proteínas implicadas en el control de la excitabilidad neuronal<sup>41,42,43</sup>. Sus mutaciones conducen a un aumento de la hiperexcitabilidad neuronal y además, tomadas en conjunto, producen un aumento de glutamato y K<sup>+</sup> a nivel de la hendidura sináptica, lo que facilitaría la generación de la depresión propagada cortical (DPC). Un tercer punto a favor de un origen central de la migraña son los estudios de neuroimagen funcional que han conducido a una re-evaluación de los mecanismos centrales involucrados en la fisiopatología de la migraña. Un primer estudio de PET realizado durante ataques espontáneos de migraña mostró una activación de la región dorsal de la protuberancia que se ha replicado con posterioridad tanto para migraña espontánea como inducida<sup>44</sup>. En este primer estudio la activación persistía después del tratamiento eficaz de la migraña con sumatriptán. Estudios en la fase premonitoria de la migraña han objetivado una hiperactividad del hipotálamo posterior que se extiende a áreas mesencefálicas adyacentes<sup>45</sup>. Tomados en su conjunto, estos datos sugieren la participación de estructuras nerviosas centrales, fundamentalmente a nivel hipotálamico y del tronco del encéfalo, en los mecanismos de generación del dolor.

### **3.4. Depresión propagada cortical.**

Descrita originalmente en 1944 por Leao, la DPC es el correlato experimental del aura. Se trata de una onda de despolarización, generada por una estimulación focal de la corteza, que una vez iniciada se propaga a través de la materia gris del cerebro a una velocidad de 2 a 6 mm/minuto<sup>46,47</sup>. Esto produce cambios en la actividad sináptica, las concentraciones de iones extracelulares, el metabolismo y el flujo sanguíneo. La DPC produce un aumento de actividad eléctrica e hiperemia

inicial de corta duración y posteriormente una depresión de la actividad eléctrica y oligoemia de larga duración<sup>48,49</sup>.

Debido a la dificultad del registro directo del correlato eléctrico de la DPC en humanos, la primera evidencia convincente a favor del papel de la DPC en el aura migrañosa se obtuvo a través de los estudios de neuroimagen (RM, SPECT y PET) que registraron el flujo sanguíneo cerebral durante ataques de migraña. En estos estudios se observó una onda de oligoemia propagada desde el lóbulo occipital a las regiones anteriores del cerebro<sup>50,51,52,53</sup>. Otra línea de evidencia indirecta del papel de la DPC como el sustrato biológico del aura proviene de los resultados obtenidos en estudios en animales transgénicos. Ratones que expresan mutaciones de migraña hemipléjica familiar en los genes CACNA1A y ATP1A2 exhiben umbrales de inducción de DPC más bajos, especialmente las hembras<sup>54,55</sup>.

La relación entre DPC y la migraña se cree mediado por la activación de la vía trigémino-vascular a nivel de los nociceptores meníngeos. En apoyo de esta hipótesis se ha comprobado como tras una DPC en el córtex occipital se activa la descarga de las neuronas del ganglio trigémino (GT) y núcleo trigeminal (NT) espinal caudal con una latencia de aproximadamente 15 minutos desde su inicio<sup>56,57,58</sup>. En la misma línea, la presencia de expresiones faciales perturbadoras (sugestivas de dolor) en animales, la degranulación de mastocitos duros y dilatación de la arteria meníngea media 15 minutos después de la DPC ipsilateral, proporcionó un apoyo adicional de la activación del STV por la DPC<sup>59,60</sup>. Este lapso de tiempo -entre la DPC y la aparición de cefalea y el desarrollo de signos de activación del STV- está en línea con la relación entre la fase de aura migrañosa y la cefalea migrañosa propiamente dicha. Otra evidencia experimental para esta relación se proporcionó mediante la detección de c-fos (un marcador indirecto, pero detectable histológicamente, de activación neuronal intensa) en las láminas I y II de C1-C2 tras la DPC<sup>61</sup>.

El registro eléctrico directo de la DPC en animales lisencefálicos (como ratones, ratas, roedores o palomas) es fácilmente reproducible. Sin embargo, en animales girencefálicos (gatos y monos) la DPC sólo es evocada tras estímulos de alta intensidad, quedando limitada su propagación a áreas próximas a la zona estimulada<sup>62</sup>. Por lo tanto, en contra de esta teoría, se ha hipotetizado que la estructura de cerebros girencefálicos limita la propagación de la onda entre las circunvoluciones<sup>63,64</sup>. Además, los intentos de provocar la DPC en personas con un parénquima cerebral estructuralmente sano han resultado infructuosos en humanos. Este registro directo de la DPC ha sido posible únicamente en personas con lesiones parenquimatosas graves (traumatismos

craneoencefálicos, ictus...) a las que se les realizó una craniectomía<sup>65,66,67</sup>. En un estudio realizado en 1000 pacientes epilépticos conscientes previo a una cirugía de la epilepsia, ni la deformación mecánica ni la estimulación eléctrica de la corteza provocaron una respuesta que se asemejara remotamente al aura o a la DPC<sup>68</sup>. De manera similar, la estimulación mecánica, eléctrica, química o térmica no fue suficiente para evocar la DPC en 23 pacientes conscientes, pese a que los mismos autores pudieron inducirla en ratas usando las mismas técnicas<sup>69</sup>.

Actualmente, aunque todavía en debate, la principal hipótesis fisiopatológica sostiene que, si bien el fenómeno de DPC o la inflamación neurogénica pueden actuar como desencadenantes, la migraña es una enfermedad donde el origen del dolor se encuentra en el sistema nervioso central mientras que la activación del sistema trigémino-vascular (STV) interviene en la expresión de síntomas periféricos y en las características del dolor.

#### 4. SISTEMA TRIGÉMINO-VASCULAR.

Como se ha descrito con anterioridad, se han propuesto distintas teorías fisiopatológicas de la migraña -que aunque no concluyentes ni definitivas- pueden considerarse como complementarias. En conjunto, estas teorías sugieren la participación de estructuras neurovasculares periféricas y centrales. Como nexo de unión entre ambas, el STV presenta un papel destacado en los mecanismos de producción del dolor y de los síntomas asociados.

La descripción de la anatomía del STV ha ayudado a entender la fisiopatología de la migraña y la distribución del dolor. Inicialmente, el concepto de STV hacía referencia a la relación anatomofuncional entre las proyecciones aferentes periféricas del nervio trigémino y los vasos sanguíneos intracraneales<sup>21</sup>. Posteriormente, el concepto se amplió para incluir no sólo las terminaciones periféricas, sino también el GT, sus proyecciones aferentes centrales al tronco del encéfalo y primeros segmentos cervicales (complejo trigémino-cervical) y sus conexiones ascendentes al tálamo y a las áreas corticales implicadas en el procesamiento del dolor<sup>70</sup> (fig.1).

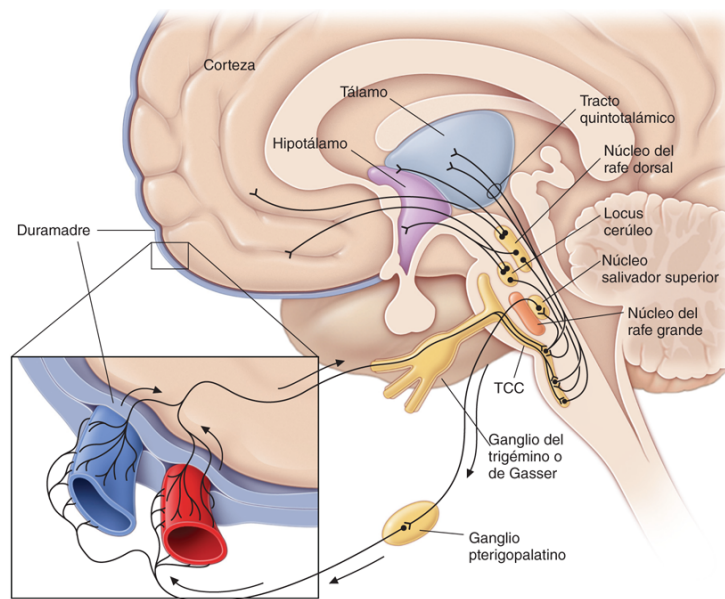


Figura 1. Sistema trigémino-vascular

Tomado de: Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J editors. Harrison. Principios de Medicina Interna 19ª ed. McGraw-Hill Education, 2016.



#### 4.1. Proyecciones aferentes periféricas.

La participación de estas proyecciones sensitivas aferentes en la fisiopatología del dolor se basa en la demostración de que la estimulación de estas estructuras -fundamentalmente la duramadre- mediante estímulos eléctricos, térmicos o mecánicos, resulta en un dolor de cabeza de características migrañosas<sup>7</sup>.

Estudios anatómicos en hombres y animales han demostrado que las meninges reciben inervación sensitiva que se origina fundamentalmente en células del GT, así como en los ganglios de las raíces dorsales de los primeros segmentos cervicales<sup>71,72,73</sup>. Estas terminaciones sensitivas aferentes periféricas del GT constituyen las tres ramas del nervio trigémino: oftálmica, maxilar y mandibular. Observaciones anatómicas clásicas ya describen la participación de las tres ramas del trigémino en la inervación meníngea, aunque no en igual proporción, predominando la inervación a través de la rama oftálmica. Más concretamente, se ha descrito que las aferencias de la arteria meníngea media se originan en mayor medida en la división oftálmica y en menor medida en la maxilar y mandibular<sup>71,72</sup>. Por otro lado, la inervación de la duramadre de la fosa craneal anterior y el tentorio del cerebelo es realizada fundamentalmente por la rama oftálmica<sup>74</sup> y la duramadre de la fosa craneal media esta inervada por la rama mandibular y en menor medida maxilar<sup>75</sup>.

Estas proyecciones aferentes periféricas están formadas por un rico plexo de fibras nerviosas nociceptivas amielínicas (fibras C) y finamente mielinizadas (fibras A $\delta$ ) que inervan además de las meninges, estructuras vasculares intracraneales incluyendo los vasos sanguíneos piales, aracnoideos y dures, los principales senos venosos y las ramas principales del polígono de Willis<sup>76,77</sup>. Junto con las fibras aferentes sensitivas, forman parte de este plexo otras fibras nerviosas eferentes del sistema nervioso autónomo: 1) fibras simpáticas originadas en el ganglio cervical superior que inervan fundamentalmente las arterias meníngeas anterior, media y posterior<sup>78,79</sup> y 2) fibras parasimpáticas que se originan en los ganglios ótico y esfenopalatino y que se localizan mayoritariamente alrededor de los grandes vasos cerebrales<sup>80,81</sup>. Funcionalmente, las fibras trigeminales y parasimpáticas median la vasodilatación arterial, mientras que las fibras nerviosas simpáticas provocan la vasoconstricción<sup>82,83</sup>.

Numerosos estudios han mostrado una organización compleja de la terminación de estas fibras:

- a nivel leptomeníngeo, las fibras aferentes sensitivas y autonómicas (de predominio parasimpático) terminan en la pared de las arterias cerebrales situada en el espacio subaracnoideo,

no penetrando en la corteza cerebral. Los péptidos más relevantes que se expresan en las fibras parasimpáticas son el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), junto con otros neurotransmisores clásicos como la acetilcolina o el ON<sup>84</sup>.

- a nivel de la duramadre se localizan fibras nerviosas sensitivas aferentes y fibras autonómicas de predominio simpático. Estas fibras nerviosas sensitivas aferentes terminan tanto en la proximidad y pared de los vasos sanguíneos duros, como entre los haces del tejido conectivo situado entre dichos vasos<sup>85</sup>. Los axones terminales de las fibras sensitivas, contienen diferentes neuropéptidos con efecto vasoactivo, como el péptido en relación con el gen de la calcitonina (CGRP), SP y en menor medida PACAP entre otros<sup>85,86</sup>. Aquellas terminaciones que contienen SP terminan en la capa adventicia, mientras que aquellas con CGRP terminan en la capa muscular. En las fibras simpáticas predomina la expresión de neuropéptido Y<sup>81</sup>. En relación con la terminación nerviosa de las fibras sensitivas aferentes, análisis de microscopía electrónica han demostrado la presencia de mastocitos perivasculares alrededor de arterias, venas y senos venosos<sup>87,88</sup>. Estudios en ratas han demostrado que la densidad de estos mastocitos experimenta cambios durante el ciclo menstrual dependientes de los niveles de estrógenos.
- a nivel extracraneal, estudios recientes que han retomado observaciones clásicas, han descrito como las terminaciones nerviosas meníngeas periféricas pueden atravesar el cráneo a través de las suturas e inervar el periostio y las capas profundas de los músculos pericraneales adyacentes<sup>89,90</sup>. Se estima que aproximadamente el 30% de la inervación sensitiva periostal y muscular pericraneal se origina a partir de ramas aferentes que atraviesan las suturas desde las terminaciones intracraneales. La presencia de neuronas con terminaciones sensitivas de localización intra y extracraneal sugiere la posibilidad de que estímulos extracraneales puedan activar la vía sensitiva meníngea y por lo tanto producir síntomas similares a los producidos por los estímulos intracraneales<sup>91</sup>.

#### **4.2. Ganglio trigeminal, de Gasser o semilunar.**

Las terminaciones sensitivas aferentes periféricas confluyen en el GT -situado extracranealmente en el espacio de Meckel de la fosa craneal media- donde reside la mayor parte de los somas neuronales de las células nerviosas sensitivas. En humanos se estima que existen entre 20.000 y 35.000 neuronas en el GT y aproximadamente 100 veces más de células no neuronales. Cada soma neuronal se rodea de una capa de células gliales satélite<sup>92</sup>. El inicio de las proyecciones periféricas y

centrales esta envuelto por células de Schwann. Las células de Schwann pueden ser no mielinizadas (fibras C) o formar capas de mielina como en las fibras A $\delta$ . Además de la glía, el GT contiene fibroblastos que forman haces de colágeno, pequeños vasos sanguíneos y varios tipos de células inmunes como la microglía<sup>93</sup>.

La mayor parte de neuronas péptidérgicas del GT expresa CGRP, representando estas últimas aproximadamente un 50% del total de neuronas del ganglio<sup>94</sup>. Un subgrupo menor de neuronas, hasta un 33%, co-expresa CGRP y SP<sup>95</sup>. PACAP se expresa hasta en un 29% de neuronas, de las cuales, el 23% coexpresa además CGRP<sup>96</sup>. Se ha descrito una comunicación funcional entre neuronas, macrófagos y/o células gliales. Estudios in vitro han evidenciado que la liberación de CGRP puede estimular células satélite y neuronas circundantes. De esta manera, CGRP funciona como un factor paracrino estimulando células satélites y neuronas cercanas<sup>97</sup>.

#### **4.3. Proyecciones aferentes centrales.**

Las prolongaciones centrales de las neuronas del GT constituyen la raíz sensitiva del nervio trigémino, que entra en el tronco del encéfalo a nivel de la cara anterolateral de la protuberancia. Los axones sinaptan con neuronas sensitivas de segundo orden localizadas en el núcleo trigeminal (NT). El NT es el más grande de los núcleos de los nervios craneales y se extiende desde el mesencéfalo hasta el segundo segmento cervical de la médula espinal. A su vez, el NT se divide en tres núcleos: 1) mesencefálico, 2) principal o pontino y 3) espinal. El NT espinal tiene una organización anatómica y funcional rostrocaudal con tres componentes: 1) núcleo oral, 2) núcleo interpoler y 3) núcleo caudal<sup>98</sup>. El NT espinal caudal también se denomina asta dorsal bulbar para enfatizar su transición anatómica y funcional con la parte alta de la médula espinal donde se funde gradualmente con el asta posterior de C1-C3 formando el complejo trigémino-cervical (CTC)<sup>99,100</sup>. El CTC presenta una subdivisión laminar similar a las láminas de Rexed en el asta posterior medular<sup>59</sup>.

Los núcleos trigeminales presentan funciones sensitivas diferenciadas. Los axones de gran diámetro que median la propiocepción de la musculatura mandibular sinaptan en el NT mesencefálico. Los axones mielinizados que conducen la sensibilidad táctil sinaptan principalmente en el NT principal. Por último, las fibras aferentes nociceptivas (Fibras C y A $\delta$ ) sinaptan principalmente en el NT espinal y más concretamente en las láminas I y II del núcleo caudal<sup>101</sup>. Las aferencias procedentes de la arteria meníngea media y el seno longitudinal superior convergen, a nivel del NT espinal

caudal, con aferencias sensitivas procedentes de regiones faciales inervadas por la rama oftálmica trigeminal. Esta y otras convergencias de entradas neuronales de estructuras intra y extracraneales explican la distribución y sienta la base anatómica del dolor en la migraña<sup>102</sup>.

Las terminaciones de las proyecciones aferentes nociceptivas centrales que contienen SP y CGRP se localizan en las láminas superficiales (I y II) del NT espinal caudal<sup>103,104</sup>. La inmunoreactividad para terminaciones con SP también se encuentra en las láminas profundas (IV/V)<sup>105</sup>. Un estudio en animales en el que se realiza rizotomía del GT mostró la supresión de CGRP con preservación de SP en el NT espinal caudal<sup>106,104</sup>. Paralelamente, la estimulación eléctrica del GT en ratas produce el agotamiento de la inmunoreactividad de CGRP en el tronco medular ipsilateral<sup>107,108</sup>. Finalmente, la inyección de CGRP en el NT espinal caudal del gato, aumenta la actividad de las neuronas de segundo orden en respuesta a la estimulación eléctrica de la duramadre<sup>109</sup>. Estos hallazgos sugieren que el CGRP se origina en el GT y una acción facilitadora nociceptiva en el tronco del encéfalo.

#### **4.4. Proyecciones desde el tronco del encéfalo y tálamo a estructuras córtico-subcorticales.**

Las aferencias originadas en las neuronas de segundo orden del CTC pueden clasificarse en función de su origen en las distintas láminas celulares<sup>110</sup>.

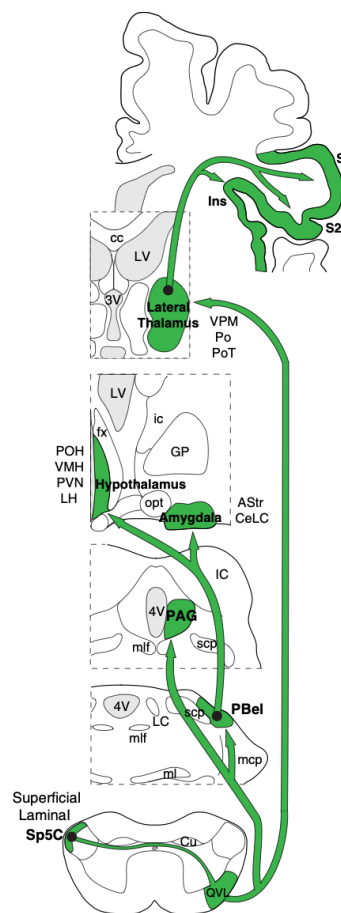
a) Axones de neuronas con somas en la lámina I (fig. 2)

- Vía espino/trigémino-talámica directa. Constituida por axones que cruzan la línea media y se unen al lemnisco espinal en su camino hacia el tálamo finalizando en núcleos del tálamo lateral como núcleos del complejo posterior (Po), del triángulo posterior (TP) y el núcleo ventral posterolateral y ventral posteromedial (VPM)<sup>111,112</sup>. Las terminaciones axonales del tálamo lateral proyectan fundamentalmente sobre la corteza somatosensorial primaria (S1) y secundaria y son importantes para los aspectos discriminativos del dolor como la localización y la intensidad<sup>113</sup>.
- Otras vías. Constituidas por proyecciones a áreas implicadas en funciones afectivas, emocionales y autonómicas:
  - Conexión refleja desde el núcleo del trigémino al núcleo salival superior (NSS). Este conjunto de neuronas preganglionares colinérgicas proporciona inervación parasimpática a la vasculatura cerebral, las glándulas lacrimales, la mucosa nasal y palatina, a través del ganglio pterogopalatino<sup>114,115</sup>. Implicado en los síntomas autonómicos observados en la migraña y otras cefaleas primarias<sup>116</sup>.

- Conexiones con el núcleo parabraquial lateral externo (PBe) y la sustancia gris periacueductal (PAG) ventrolateral. PBe proyecta hacia el núcleo central de la amígdala y el núcleo del lecho de la estría terminal, involucrados en la ansiedad y las reacciones al miedo<sup>116</sup>. También proyecta al núcleo ventromedial hipotalámico que expresa el péptido colecistoquinina, participando en el control del apetito<sup>117</sup>. Las conexiones de PBe proporcionan un sustrato para la integración de actividad aferente nociceptiva y regiones involucradas en funciones emocionales, autónomas y neuroendocrinas. La activación de la región ventrolateral del PAG produce respuestas antinociceptivas, cardiovasculares y defensivas, como la disminución de la presión arterial, inmovilidad, comportamiento de evitación y un estado emocional de miedo y ansiedad<sup>119</sup>.
- Conexiones directas con núcleos hipotalámicos. A través del tracto trigémino-hipotalámico conecta con los núcleos anterior, lateral, posterior, mediodorsal, así como los núcleos perifornical, paraventricular y supraóptico<sup>118,120,121,122</sup>. La activación hipotalámica probablemente afecta al ritmo del sueño, la ingesta de alimentos, la termorregulación, la excitación y las reacciones emocionales, entre otras funciones. Aparece además como una estructura fundamental en los síntomas premonitorios de la migraña como la fatiga, el bostezo, somnolencia, irritabilidad, hambre, etc.<sup>123</sup>

Figura 2. Vía nociceptiva ascendente desde la lámina superficial del CTC

Tomado de: Noseda R, Villanueva L. Functional architecture of central pain pathways: focus on the trigeminovascular system. En: Dalkara T, Moskowitz MA, editors. Neurobiological basis of migraine. Wiley-Blackwell; 2017. p. 69-90.



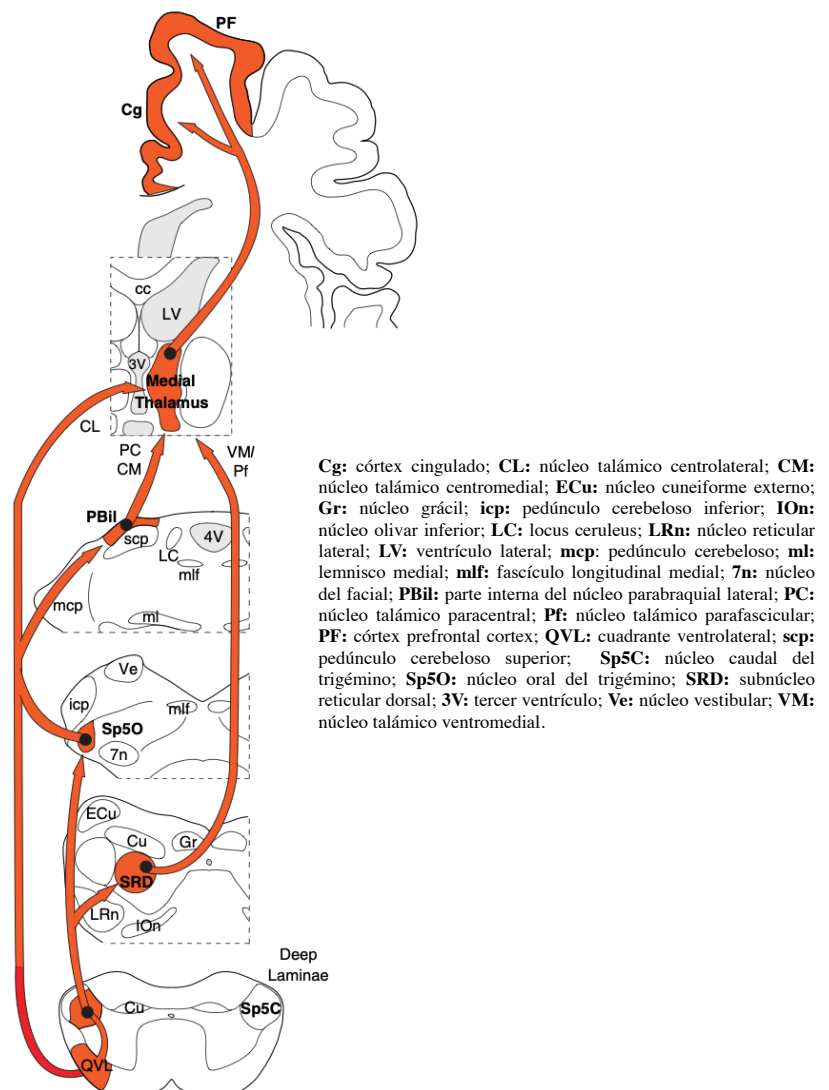
**AStr:** área de transición amigdalostriatal; **cc:** cuerpo caloso; **CeLC:** parte capsular lateral del núcleo amigdalino central; **Cg:** córtex cingulado; **CL:** núcleo talámico centrolateral; **CM:** núcleo talámico centromedial; **ECu:** núcleo cuneiforme externo; **fx:** fornix; **GP:** globo pálido; **Gr:** núcleo grácil; **ic:** cápsula interna; **icp:** pedúnculo cerebeloso inferior; **Ins:** córtex insular; **ION:** núcleo olivar inferior; **LC:** locus ceruleus; **LH:** núcleo hipotalámico lateral; **LRn:** núcleo reticular lateral; **LV:** ventrículo lateral; **mcp:** pedúnculo cerebeloso medio; **ml:** lemnisco medial; **mlf:** fascículo longitudinal medial; **7n:** núcleo del facial; **opt:** tracto óptico; **PAG:** sustancia gris periacueductal; **PBel:** parte externa del núcleo parabraquial lateral; **PBiI:** parte interna del núcleo parabraquial lateral; **PC:** núcleo talámico paracentral; **pf:** núcleo talámico parafascicular; **PF:** córtex prefrontal; **Po:** complejo de núcleos talámicos posteriores; **POH:** región hipotalámica preóptica; **PoT:** núcleo talámico triangular posterior; **PVN:** núcleo hipotalámico paraventricular; **QVL:** cuadrante ventrolateral; **S1:** córtex somatosensorial primario; **S2:** córtex somatosensorial secundario; **scp:** pedúnculo cerebeloso superior; **Sp5C:** núcleo caudal del trigémino; **Sp5O:** núcleo oral del trigémino; **SRD:** subnúcleo reticular dorsal; **3V:** tercer ventrículo; **4V:** cuarto ventrículo; **Ve:** núcleo vestibular; **VMH:** núcleo hipotalámico ventromedial; **VMI:** parte lateral del núcleo talámico ventromedial; **VPM:** núcleo talámico central posteromedial.

b) Axones de neuronas con somas en capas profundas V-VI. (fig. 3)

- Vía trigémino-retículo-talámica. Constituida por axones que proyectan a la formación reticular bulbar y finalizan en el tálamo medial, concretamente los núcleos ventromedial y parafascicular<sup>124</sup>. Esta vía presenta conexiones con el subnúcleo dorsal reticular (SDR) de la formación reticular bulbar que contiene neuronas que reciben aferencias nociceptivas del resto del cuerpo y proyectan a través del tálamo medial a la capa I de todo el neocórtex dorsolateral<sup>125,126</sup>. De esta manera cualquier estímulo doloroso puede modificar la actividad cortical de manera global incluyendo áreas prefrontales, premotoras y motoras.
- Vía trigémino-parabraquial-talámica. Constituída por axones que proyectan con el núcleo parabraquial lateral interno (PBi) y desde allí a los núcleos talámicos mediales. Desde el tálamo medial esta vía termina fundamentalmente en la corteza prefrontal y corteza cingulada anterior, participando en los aspectos cognitivos, atencionales y emocionales del dolor como sensaciones desagradables y sufrimientos que evocan los estímulos dolorosos<sup>127</sup>.

Figura 3. Vía nociceptiva ascendente desde la lámina profunda del CTC.

Tomado de: Noseda R, Villanueva L. Functional architecture of central pain pathways: focus on the trigeminovascular system. En: Dalkara T, Moskowitz MA, editors. Neurobiological basis of migraine. Wiley-Blackwell; 2017. p. 69-90.



#### 4.5. Proyecciones moduladoras descendentes.

La activación de las vías nociceptivas trigeminales del STV puede estar causada por una pérdida de las influencias inhibitorias descendentes sobre el mismo. Estos sistemas de control descendentes inhibitorios son originados en el tronco del encéfalo, hipotálamo y corteza cerebral (fig. 4).

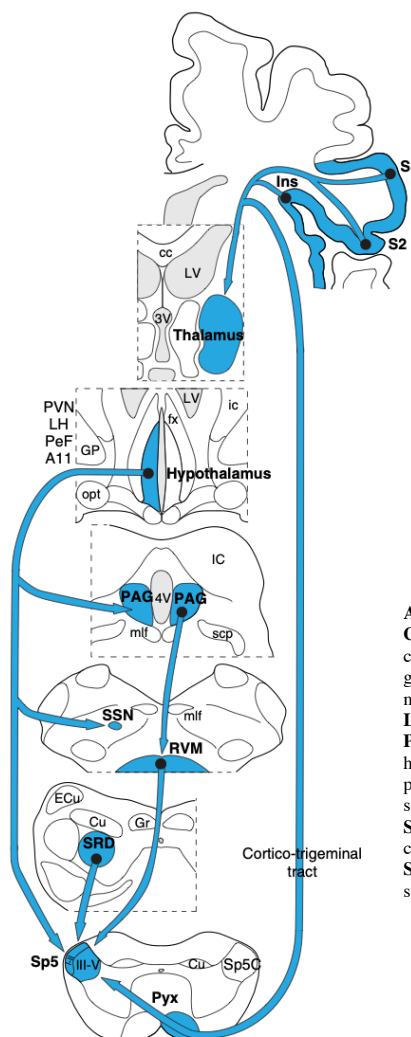
- A nivel del tronco del encéfalo destaca en papel modulador descendente de la PAG y la médula ventromedial rostral (RVM). Estudios en animales demostraron que la microestimulación localizada en la PAG ventral o en la RVM producía efectos antinociceptivos cuando se aplicaba un estímulo nocivo en cualquier parte del cuerpo<sup>128</sup>. Dado que la PAG proyecta mínimamente a la médula espinal pero densamente al RVM, esta última constituye su principal enlace para la modulación descendente al asta posterior medular y trigeminal<sup>129,130</sup>. En el campo de la migraña su papel es controvertido. Las primeras publicaciones describían un dolor de características migrañosas en pacientes sometidos a la implantación de un electrodo cerca de la PAG<sup>131</sup>, y un estudio de RM cerebral funcional mostró la activación de la PAG durante un ataque de migraña espontánea por lo que se consideró la PAG como un núcleo generador de migraña<sup>44</sup>. En contraposición, se ha descrito que la estimulación de la PAG inhibe la actividad neuronal provocada en el NT espinal caudal y que el bloqueo de los canales de calcio tipo P/Q en la PAG facilita la actividad de las neuronas nociceptivas del NT espinal caudal<sup>132,133</sup>. Finalmente, estudios posteriores de neuroimagen funcional no incluyen la PAG como una región activada en ataques de migraña espontáneos o inducidos y sí otros núcleos cercanos como el NT mesencefálico, el NT principal, el PB, el núcleo vestibular, el cuneiforme, el locus coeruleus y el colículo inferior<sup>134,135</sup>.
- Controles inhibitorios nociceptivos difusos. Funcionalmente, corresponden a una modulación condicionada por el dolor. Por ejemplo, cuando tenemos un estímulo doloroso persistente, la aparición de un dolor agudo causa una reducción en la percepción del primer estímulo<sup>136</sup>. Las estructuras supraespinales relacionadas con esta inhibición incluyen el SDR bulbar<sup>137</sup>. En un estudio realizado comparando sujetos sanos con pacientes de ME y MC, se observó que un nuevo estímulo doloroso reducía la percepción del previo en los sujetos sanos, lo hacía con menor intensidad en los pacientes de ME y por el contrario no inhibía sino que potenciaba el dolor previo en pacientes con MC<sup>138</sup>.
- Estudios en animales muestran conexiones anatómicas directas entre núcleos hipotalámicos y el NT espinal caudal y conexiones indirectas a estructuras del tronco cerebral involucradas en el procesamiento nociceptivo como es la PAG<sup>139</sup>. El núcleo hipotalámico paraventricular (NPV) y

el núcleo A11 envían proyecciones a las láminas I/II del NT espinal caudal<sup>140</sup>. La depresión experimental de las células del NPV mediante la inyección de un agonista gabaérgico inhibe tanto la actividad basal de neuronas del NT espinal caudal, como la actividad provocada por las aferencias nociceptivas de las meninges y por el contrario los antagonistas gabérgicos aumentan estas respuestas<sup>141</sup>. La estimulación de las neuronas dopaminérgicas del área A11 inhibe la activación de neuronas del NT espinal caudal provocadas por la estimulación de la arteria meníngea media y este efecto es bloqueado por antagonistas de los receptores D2<sup>142</sup>.

- La principal función moduladora de la corteza depende en gran medida de su interacción recíproca con el tálamo. Existen 10 veces más fibras que proyectan desde la corteza al tálamo que al revés<sup>143</sup>. Aunque los mecanismos no se han dilucidado completamente, es probable que la inactivación del área cortical S1 produzca cambios rápidos en las propiedades de las neuronas talámicas somatosensoriales<sup>144</sup>. Por otro lado, algunos estudios anatómicos han sugerido la presencia de proyecciones directas descendentes desde la corteza cerebral hasta el NT espinal caudal en ratas y en humanos<sup>145</sup>. Se ha descrito que la estimulación de S1 produce una inhibición de la respuesta de neuronas nociceptivas del NT espinal caudal<sup>146</sup>.

Figura 4. Modulación descendente de la vía nociceptiva

Tomado de: Noseda R, Villanueva L. Functional architecture of central pain pathways: focus on the trigeminovascular system. En: Dalkara T, Moskowitz MA, editors. Neurobiological basis of migraine. Wiley-Blackwell; 2017. p. 69-90.



**A11:** grupo celular dopaminérgico; **cc:** cuerpo calloso; **CeLC:** parte capsular lateral del núcleo amigdalino central; **ECu:** núcleo cuneiforme externo; **fx:** fornix; **GP:** globo pálido; **Gr:** núcleo grácil; **ic:** cápsula interna; **LH:** núcleo hipotalámico lateral; **LRn:** núcleo reticular lateral; **LV:** ventrículo lateral; **mif:** fascículo longitudinal medial; **PAG:** sustancia gris periacueductal; **PeF:** núcleo hipotalámico perifornical; **PVN:** núcleo hipotalámico paraventricular; **Pyx:** decusación piramidal; **S1:** córtex somatosensorial primario; **RVM:** médula ventral rostral; **S2:** córtex somatosensorial secundario; **scp:** pedúnculo cerebeloso superior; **Sp5C:** núcleo caudal del trigémino; **SRD:** subnúcleo reticular dorsal; **SSN:** núcleo salivar superior; **3V:** tercer ventrículo; **4V:** cuarto ventrículo.



## 5. PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP)

CGRP fue identificado a principios de los años 80 cuando se descubrió que podría existir un procesamiento alternativo del ARN mensajero del gen de la calcitonina<sup>147</sup>. CGRP es un neuropéptido de 37 aminoácidos de la familia de péptidos denominados calcitoninas, en los que también se incluyen calcitonina, amilina y adrenomedulina I y II<sup>148</sup>. En los seres humanos existen 2 isoformas denominadas CGRP $\alpha$  y CGRP $\beta$ . Estas isoformas son sintetizadas a partir de dos genes diferentes, CALCI y CALCII, localizados en el cromosoma 11. El gen CALCI mediante splicing alternativo da lugar a calcitonina o CGRP $\alpha$ , mientras que la transcripción de CALCII genera CGRP $\beta$ . Ambas isoformas presentan una homología mayor del 90%, difiriendo sólo en tres aminoácidos, y presentan unos efectos biológicos similares. CGRP $\alpha$  se expresa fundamentalmente en los nervios periféricos sensitivos y el sistema nervioso central, mientras que CGRP $\beta$  se expresa en neuronas motoras y en el sistema nervioso entérico<sup>149</sup>.

### 5.1. Tipos de receptores de CGRP

El receptor funcional de CGRP es un receptor asociado a proteína G formado por tres subunidades: un receptor similar a la calcitonina (CLR), un dominio proteínico transmembrana denominado proteína modificadora de actividad del receptor (RAMP) y una proteína componente del receptor (RCP) (fig. 5). Se conocen tres tipos de RAMP: RAMP1, RAMP2 y RAMP3. El receptor de CGRP (CGRP<sub>r</sub>) consta de CLR y RAMP1; la dimerización de CLR y RAMP2, forman un receptor que se une a adrenomedulina; y la unión de CLR y RAMP3, da lugar a un segundo receptor de adrenomedulinas que también presenta afinidad frente a CGRP<sup>149</sup>.

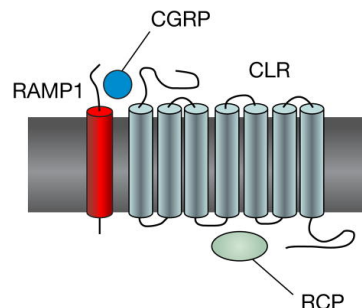


Figura 5. Receptor de CGRP.

## 5.2. Vías de señalización intracelular

La unión de CGRP al receptor CLR/RAMP1 provoca la activación de múltiples vías de señalización intracelular. La vía principal conduce a la activación de la adenilato-ciclasa, mediada por la proteína  $G_{\alpha_s}$ , lo que provoca la elevación del AMPc intracelular. Es por esto que en estudios experimentales la función de CGRP se estima midiendo los niveles de AMPc. Como resultado de la elevación de AMPc se activa la proteína quinasa A (PKA) dando lugar a la fosforilación de múltiples dianas intracelulares. Entre estas dianas se incluyen canales de  $K^+$  ATP dependientes, quinasas relacionadas con la señal extracelular (ERK) o factores de transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB). Estos mecanismos efectores median numerosas acciones de CGRP, incluyendo la vasodilatación, la liberación de neurotransmisores, el aumento de la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica. La vasodilatación mediada por CGRP puede producirse por dos vías. Por un lado, la PKA activa canales de  $K^+$  induciendo la relajación del músculo liso vascular y por tanto la vasodilatación independiente de endotelio. Por otro lado, la PKA también estimula la síntesis de ON por la óxido nítrico sintetasa endotelial dando lugar a vasodilatación dependiente de endotelio. A nivel neuronal se ha descrito que la administración de inhibidores de PKA anula la facilitación sináptica inducida por CGRP en la vía parabraquial-amigdalina<sup>150</sup>.

Aunque con menor evidencia científica, es probable que el CGRP puede acoplarse a otras proteínas G ( $G_{\alpha_{i/o}}$ ,  $G_{\alpha_{q/11}}$ ). El acoplamiento a  $G_{\alpha_{i/o}}$  atenúa la actividad de la adenilato ciclasa disminuyendo el AMPc intracelular dando como resultado la pérdida de actividad de PKA. EL acoplamiento a la  $G_{\alpha_{q/11}}$  activa proteínas como la proteína quinasa C, lo que puede explicar algunas de las funciones de CGRP en ausencia de elevación de AMPc. Igualmente el CGRP puede activar vías independientes de la proteína G, a través de la quinasa activada por mitógeno (MAPK),  $\beta$ -arrestina o proteína quinasa B/Akt.  $\beta$ -arrestina facilita la internalización y desensibilización del receptor mientras que MAPK activa ERK1/2, JNK y p38 con efectos que van desde la proliferación celular al desarrollo de tolerancia a morfínicos<sup>149</sup>.

### 5.3. Expresión de CGRP y sus receptores en regiones implicadas en la migraña.

En general, el patrón de distribución de CGRP y CGRPr es similar, pero casi nunca colocalizados en las mismas estructuras<sup>151</sup>.

- En las terminaciones de las aferencias periféricas del GT, la expresión de CGRP se limita a las fibras amielínicas o fibras C, mientras que CGRPr se encuentra en las fibras finamente mielinizadas o fibras A $\delta$ . De esta manera, el CGRP liberado en las terminales de fibras C puede actuar en las fibras A $\delta$ <sup>152</sup>. A este nivel, los CGRPr también se encuentran en las células de músculo liso arterial, en la duramadre y en los mastocitos<sup>153</sup>.
- A nivel del GT un 50% de las neuronas expresan CGRP (en somas de neuronas con proyecciones amielínicas) mientras que aproximadamente un 33% expresan el CGRPr (somas neuronales con proyecciones de fibras finamente mielinizadas). El CGRPr también se ha descrito en células satélites. Esto sugiere la posibilidad de sinapsis intragangliónicas interneuronales y con células gliales<sup>152,154</sup>.
- En las aferencias centrales del GT y del ganglio raquídeo posterior cervical, las concentraciones más altas de CGRP se encuentran en la región superficial del CTC, correspondientes a las láminas I y II del NT espinal caudal y al asta posterior de C1-C2. A este nivel, CGRPr y CGRP presentan una distribución similar a la ya descrita con anterioridad, es decir CGRP en las fibras C y CGRPr en las fibras A $\delta$ . Puesto que no se ha demostrado la presencia ni de CGRP ni de su receptor en el soma neuronal del CTC, se piensa que CGRP interviene en la modulación de las sinapsis entre las proyecciones centrales del GT y el tronco del encéfalo a nivel presináptico<sup>155,156</sup>.
- En el sistema nervioso central, CGRP se distribuye fundamentalmente en el tronco del encéfalo, tálamo, hipotálamo, amígdala, cuerpo estriado y cerebelo. En la mayoría de estas regiones CGRP se encuentra en el soma neuronal, mientras que los receptores se encuentran en los tractos de sustancia blanca y no a nivel del soma neuronal. Sólo a nivel de algunos núcleos hay CGRPr en fibras entremezcladas entre las neuronas<sup>157</sup>.

## **6. CGRP EN MIGRAÑA.**

La relación entre CGRP y migraña está fundamentada en los resultados obtenidos en estudios realizados en pacientes migrañosos y modelos de migraña. Estos estudios se basan, por un lado, en la determinación de niveles de CGRP en pacientes migrañosos y su comparación con pacientes sanos, y por el otro, en la variación de dichos niveles en respuesta al tratamiento.

### **6.1. Relación entre CGRP y migraña.**

#### 6.1.1. Estudios observacionales.

La primer trabajo acerca de la existencia de una relación entre CGRP y la migraña se publicó en 1988, cuando Goadsby y Edvinsson publicaron el hallazgo de que pacientes afectados de neuralgia del trigémino, a los que se realizaba termocoagulación del GT y que mostraban enrojecimiento facial, presentaban valores elevados de CGRP en sangre obtenida de la vena yugular externa<sup>158</sup>. Posteriormente, estos mismos autores demostraron que los niveles de CGRP, durante un ataque de migraña, se encontraban elevados en muestras de sangre obtenida en la vena yugular<sup>159</sup>. Más tarde, un estudio replicó la elevación de CGRP durante los ataques y demostró que la administración de sumatriptan aliviaba la cefalea y disminuía los niveles de CGRP en sangre periférica<sup>160</sup>. Posteriormente, y debido a las dificultades en la obtención de las muestras sanguíneas de la vena yugular, diversos grupos determinaron los niveles de CGRP en sangre periférica<sup>161,162,163</sup>. De este modo se objetivó la elevación de CGRP durante los ataques de migraña y su neutralización con la administración de triptanes<sup>163</sup>. Así mismo, se ha descrito que los niveles de CGRP en sangre periférica durante los ataques de migraña son máximos a las 2 horas del inicio del ataque, disminuyen durante las 2 horas siguientes y vuelven a la normalidad 2 horas antes del final de la crisis<sup>163</sup>. Solamente dos estudios no han encontrado niveles de CGRP elevados durante las crisis de migraña. En uno de ellos los investigadores visitaban a los pacientes en su casa o lugar de trabajo. Teniendo en cuenta la corta vida media de CGRP, probablemente el tiempo entre la obtención de la muestra y su análisis fue demasiado prolongado, lo que explicaría los bajos niveles de neuropéptido en dichas muestras<sup>164,165</sup>. En el otro, la justificación se basa en la ausencia de comparación entre niveles ictales e interictales en los mismos pacientes<sup>159</sup>.

Existen además trabajos que defienden la elevación de los niveles de CGRP, en sangre periférica de pacientes migrañosos, durante el periodo intercrítico<sup>166,167</sup>. Hallazgos similares han sido encontrados midiendo niveles de CGRP en saliva y líquido cefalorraquídeo de pacientes migrañosos sin cefalea<sup>168,169</sup>. Un estudio de Ashina et al. no mostró diferencias en los niveles plasmáticos interictales de CGRP de pacientes con cefalea tensional crónica comparados con controles. Sin embargo un análisis posterior mostró que en 8 de los pacientes, cuya cualidad de cefalea era pulsátil y que de acuerdo con los actuales criterios de la IHS hubieran sido diagnosticados de migraña crónica, los niveles de CGRP en sangre periférica estaban significativamente elevados respecto a los controles<sup>169</sup>.

De lo expuesto con anterioridad podemos concluir que los niveles de CGRP en migraña aguda se encuentran elevados durante las crisis. Además es posible plantearse que los niveles de CGRP interictales pueden encontrarse elevados en la sangre periférica de pacientes migrañosos en comparación con sujetos sanos.

| <b>NIVELES DE CGRP</b>         |              |                   |
|--------------------------------|--------------|-------------------|
| <b>MUESTRA</b>                 | <b>ICTAL</b> | <b>INTERICTAL</b> |
| <b>SANGRE PERIFÉRICA</b>       |              |                   |
| Goadsby et al.                 | ↑            |                   |
| Sarchielli et al.              | ↑            | ↑                 |
| Rodríguez-Osorio et al.        | ↑            |                   |
| Fusayasu et al.                |              | ↑                 |
| Ashina et al.                  |              | ↑                 |
| Jang et al.                    |              | ↑                 |
| Ashina et al.                  |              | ↑                 |
| <b>SALIVA</b>                  |              |                   |
| Jang et al.                    |              | ↑                 |
| Bellami et al.                 |              | ↑                 |
| <b>LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO</b> |              |                   |
| Van Dingen et al.              | ↑            | ↑                 |

### 6.1.2. Estudios experimentales.

La segunda indicación de la existencia de un vínculo entre CGRP y migraña es el hecho de que la inyección intravenosa de este péptido desencadena dolores de cabeza que cumplen criterios de migraña en pacientes migrañosos pero no en controles, lo que sugiere que los migrañosos son inusualmente sensibles a las acciones de CGRP<sup>170,171</sup>. Además, migrañas inducidas por CGRP fueron revertidas con la administración de un triptán objetivando una disminución de los niveles de CGRP concomitante<sup>172</sup>.

El tercer conjunto de hallazgos que implican al CGRP en la migraña se basan en la efectividad de los antagonistas selectivos del receptor de CGRP en el tratamiento de la migraña. Estos fármacos alivian el dolor y los síntomas asociados de la migraña, lo que proporciona pruebas de la implicación del CGRP en la fisiopatología de la migraña y lo convierten en objetivo válido para su tratamiento<sup>172,173</sup>.

## **6.2. Implicación fisiopatológica del CGRP en la migraña.**

La vasodilatación, la inflamación neurógena y la sensibilización periférica son las acciones periféricas de CGRP más relevantes en la migraña. Aunque a menudo se pasa por alto, CGRP también se expresa en el sistema nervioso entérico, principalmente como  $\beta$ -CGRP, donde ayuda a regular la motilidad y las secreciones gastrointestinales. Estas acciones posiblemente contribuyen a la gastroparesia y otros problemas gastrointestinales asociados a la migraña. En el sistema nervioso central su patrón de distribución relativamente amplio proporciona numerosos objetivos posibles de CGRP donde podría actuar como neuromodulador en la fotofobia, la sensibilización central y la DPC<sup>174</sup>.

### 6.2.1. Vasodilatación.

A nivel periférico, CGRP se libera por las terminaciones aferentes de las neuronas sensitivas que inervan los vasos sanguíneos de casi todos los órganos del cuerpo. El principal efecto de CGRP en la periferia es la dilatación de los lechos vasculares. Aunque el CGRP tiene propiedades vasodilatadoras en toda la vasculatura, es a nivel de la microvasculatura donde su potencia es mayor, siendo su efecto 10 veces mayor que el de las prostaglandinas y entre 100-1000 veces más

intenso que el de otras sustancias vasodilatorias<sup>149</sup>. De hecho, es el péptido vasodilatador más potente conocido, especialmente a nivel de las arterias intracraneales y concretamente por su acción sobre las células de la capa muscular. Como resultado de la unión de CGRP con su receptor se produce una activación de la proteína quinasa A y canales de K<sup>+</sup> dependientes de adenosina trifosfato (ATP) que conducen a la relajación del músculo liso vascular. Se cree que también puede favorecer la dilatación de manera indirecta estimulando la actividad de la ON sintetasa<sup>175</sup>. Un estudio de angioRM, en pacientes migrañosos durante un ataque inducido mediante la administración de CGRP, demostró la dilatación de las arterias cerebral media y meníngea media coincidente con la fase de dolor<sup>18</sup>.

### 6.2.2. Inflamación neurogéna.

CGRP contribuye tanto a la inflamación neurogéna como a la sensibilización periférica de neuronas nociceptivas a diferentes niveles.

- Como se ha explicado con anterioridad CGRP participa en la vasodilatación descrita en la inflamación neurogéna.
- Además, CGRP interviene de manera indirecta en la extravasación de plasma mediante el aumento de liberación de SP, efector último de la extravasación<sup>176</sup>.
- Una tercera y probablemente la función periférica más importante de CGRP es que puede desencadenar la desgranulación de los mastocitos, un evento que libera compuestos inflamatorios y proinflamatorios<sup>177,178</sup>. La identificación de los receptores CGRP en los mastocitos duros respalda un papel directo de CGRP en la degranulación<sup>153</sup>. Esta liberación de sustancias inflamatorias produce una retroalimentación positiva conduciendo a una mayor liberación de CGRP por las neuronas sensitivas.

### 6.2.3. Sensibilización.

La sensibilización es una característica común de diferentes entidades que cursan con dolor crónico y se cree que también participa en la fisiopatología de la migraña. Podría definirse como el proceso mediante el cual, la intensidad del estímulo necesario para generar una respuesta disminuye con el tiempo. De este modo las neuronas nociceptivas presentan un aumento de su respuesta frente a estímulos externos<sup>179</sup>.

El desarrollo de dolor palpitante en la fase inicial de la migraña está mediado por la sensibilización de las neuronas de primer orden trigémino-vasculares periféricas que inervan las meninges. Esta sensibilización se corresponde además con la intensificación del dolor en relación con actividades físicas (como inclinarse o toser) que aumentan la presión intracraneal. El desarrollo de la alodinia cutánea cefálica se produce por la sensibilización de las neuronas trigémino-vasculares de segundo orden en el tronco del encéfalo, que reciben entradas sensitivas convergentes de las meninges y del cuero cabelludo y la piel facial. Pacientes con que padecen este tipo de sensibilización refieren que durante la migraña la piel de la cara duele en respuesta a actividades inocuas como peinarse, afeitarse, lavarse o usar gafas. La presencia de alodinia extracefálica está mediada por la sensibilización de las neuronas trigémino-vasculares de tercer orden localizadas en los núcleos talámicos posteriores. Se trata de neuronas que reciben entradas sensitivas convergentes de las meninges, la piel facial y corporal. Es por ello que estos pacientes tienen la piel corporal hipersensible y al usar ropa apretada, brazaletes o anillos resulta incómodo y/o doloroso durante los ataques de migraña<sup>180</sup>. Otros ejemplos de sensibilización serían el hecho de que estímulos lumínicos, olfativos, auditivos o sensitivos que en situaciones normales no evocan respuesta, producirían fotofobia, fonofobia, náuseas y dolor.

a) Sensibilización periférica.

No se ha demostrado que CGRP active o sensibilice directamente los nociceptores meníngeos. Ni la infusión intravenosa ni la aplicación directa de GCRP en la duramadre aumentan la actividad neuronal. Esto concuerda con observaciones previas en las que la infusión endovenosa de CGRP produce un dolor tipo migrañoso pero con horas de latencia<sup>170</sup>. Esto sugiere una sensibilización producida por procesos indirectos como la regulación de la expresión de genes, aumentado la expresión del receptor P2X3 y el propio CGRP. En el GT la unión de CGRP con CGRPr en las células gliales satélite promueve la liberación de:

- citoquinas proinflamatorias incrementando la producción de mediadores inflamatorios que sensibilizan a las neuronas<sup>181</sup>. TNF- $\alpha$ , puede estimular directamente la liberación de CGRP o promover aumento de la síntesis de CGRP por una regulación al alza de la la transcripción de CALC I<sup>182</sup>.
- factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que promueve en las neuronas el aumento de transcripción del gen del receptor P2X3<sup>183</sup>. El aumento de la expresión de este gen aumenta la densidad de receptores P2X3 que una vez activados por ATP extracelular promueven la despolarización de los aferentes primarios<sup>184</sup>.



## b) Sensibilización central.

La participación de CGRP en los mecanismos de sensibilización central se ha descrito principalmente a nivel de las terminaciones centrales de neuronas sensitivas de primer orden en el asta posterior de la médula y el NT espinal, en la vía espinotalámica y en la amígdala. Esta sensibilización central viene determinada por el papel de CGRP como modulador de la transmisión glutamatérgica<sup>174</sup>.

- A nivel del asta posterior de la médula y en el CTC, CGRP actúa a nivel presináptico aumentando la liberación de glutamato y a nivel postsináptico mediante fosforilación dependiente de cAMP de los receptores AMPA y NMDA que resulta en una mayor conductancia y facilitación sináptica<sup>185,186</sup>.
- En la vía espinotalámica, los receptores de CGRP se encuentran a nivel postsináptico junto con los receptores de glutamato tipo AMPA. En esta localización, CGRP aumenta la respuesta de los receptores AMPA y potencia los efectos de la sustancia P sobre los receptores AMPA y NMDA<sup>186</sup>.
- A nivel de la amígdala CGRP aumenta la excitabilidad neuronal y facilita la transmisión sináptica de aferencias desde el núcleo parabraquial. Dentro del núcleo central de la amígdala, la sensibilización implica la fosforilación de la subunidad NR1 de los receptores NMDA. Estos efectos son bloqueados por antagonistas del receptor NMDA reforzando el papel glutamatérgico en la sensibilización central por CGRP<sup>187</sup>.

### 6.2.4. Fotofobia.

La fotofobia es un síntoma común de la migraña en la que los niveles normales de luz se perciben como desagradables o dolorosos y que puede exacerbar el dolor<sup>188</sup>. Se cree que en su génesis pueden estar involucradas vías neuronales tanto de transmisión del dolor como emocionales. Una serie de estudios en ratones ha demostrado que CGRP juega un papel en la aversión a la luz.

La participación de CGRP en la fisiopatología de la fotofobia se basa en que la administración intravenosa de CGRP a migrañosos produce ataques de migraña con fotofobia. En modelos animales de ratones genéticamente modificados con aumento de la expresión de CGRP, la administración intraventricular de CGRP provoca un comportamiento de rechazo a la luz análogo a la fotofobia y el tratamiento simultáneo con antagonistas del CGRP atenúa los comportamientos

inducidos por CGRP<sup>189,190</sup>. La convergencia de aferencias directas de células ganglionares fotosensibles de la retina con aferencias del STV en el tálamo posterior puede explicar el hecho de que la luz agrave el dolor de cabeza<sup>190</sup>. Estas neuronas talámicas presentan receptores de CGRP<sup>191</sup>. Adicionalmente, se han descrito proyecciones centrales desde las células ganglionares de la retina hacia la amígdala y otras estructuras límbicas lo cual explicaría la sensación de incomodidad asociada<sup>188</sup>. A nivel de la amígdala, se ha descrito la modulación sináptica de CGRP potenciando la neurotransmisión glutamatérgica lo que explicaría el fenómeno de sensibilización a la luz en la migraña. Además, neuronas que contienen CGRP de los núcleos talámicos intralaminares posteriores presentan proyecciones a la amígdala donde se ha sugerido que desempeñan un papel en las respuestas conductuales y autonómicas asociadas a la migraña<sup>192</sup>.

#### 6.2.5. Depresión propagada cortical.

La relación de CGRP con la DCP se ha puesto de manifiesto en múltiples estudios. En primer lugar, los factores en la DPC hay una cascada de eventos que conducen a la liberación de moléculas proinflamatorias en las meninges. En este proceso, CGRP se libera en las terminales periféricas desencadenando la inflamación neurogénica en la duramadre. Este mecanismo es consistente con la pérdida de la inflamación neurogénica inducida por la DPC tras la denervación experimental sensitiva de las meninges<sup>193</sup>. En segundo lugar, se ha implicado a CGRP en la respuesta inicial de hiperemia transitoria mediada por la acción vasodilatadora de este neuropéptido a nivel de los vasos meningeos. El sustrato de esta afirmación se basa en el hallazgo, en modelos animales, de la reversión de la vasodilatación inducida por la DPC de forma experimental tras la administración de antagonistas de CGRP<sup>194</sup>. Adicionalmente, estudios recientes realizados en ratas mostraron la liberación de CGRP por los tejidos corticales durante la DPC, mientras que la administración de antagonistas de CGRP redujeron significativamente la magnitud de este efecto de DPC in vitro<sup>195</sup>. En esta línea, un estudio reciente demostró que la inducción repetida de DPC produce una elevación mantenida de CGRP en el córtex cerebral ipsilateral. Por último, se ha comprobado el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la corteza y en el GT de ratas durante la DPC. En neuronas del ganglio raquídeo de ratones, ROS promueve la liberación de CGRP y en cultivos celulares del GT esta involucrado en la activación epigenética del gen CALCI aumentando la síntesis de CGRP<sup>196</sup>.

## **7. ONABOTULINUMTOXIN A (ONABOTA).**

La neurotoxina botulínica tipo A (TBA) es una metaloproteasa dependiente de  $Zn^{2+}$ , constituida por una cadena pesada (100 kDa) y una ligera (50 kDa), que bloquea reversiblemente la transmisión neuromuscular. Fue inicialmente empleada en el tratamiento del estrabismo y otras afecciones musculares como el espasmo hemifacial o la distonía cervical<sup>197</sup>. El descubrimiento de la eficacia de la TBA en la cefalea se produjo de manera fortuita cuando se observó que las personas con migraña que recibían inyecciones de TBA por motivos estéticos, experimentaban mejoras significativas en los síntomas de la cefalea<sup>198</sup>.

### **7.1. Mecanismo de acción.**

La cadena pesada de la TBA interacciona con receptores específicos de las terminaciones nerviosas motoras presinápticas de la placa motora promoviendo la endocitosis de la molécula<sup>199</sup>. En el interior de la terminal presináptica, la cadena ligera pasa al citoplasma, donde proteoliza SNAP-25, proteína esencial en la fusión de vesículas a la membrana citoplasmática presináptica y la liberación de acetilcolina<sup>200</sup>. La inyección intramuscular de TBA inhibe por tanto la liberación de acetilcolina en la placa motora, produciendo una denervación química parcial, reversible y transitoria del músculo, lo que genera una inhibición local de la actividad muscular durante meses<sup>201</sup>.

Puesto que la contractura de la musculatura pericraneal es frecuente en la MC, la reducción de esta contracción se ha propuesto como uno de los mecanismos de acción de la TBA en esta patología, si bien ensayos clínicos controlados han demostrado que la TBA no es eficaz en el tratamiento de la cefalea tensional crónica<sup>202</sup>. Como mecanismos alternativos a la inhibición de la actividad muscular, estudios en animales, humanos y ensayos preclínicos, han demostrado que la TBA bloquea la liberación de neurotransmisores implicados en el dolor como SP, glutamato y CGRP<sup>203</sup>. Este bloqueo de las proyecciones periféricas de las neuronas nociceptivas se postula como uno de los mecanismos fundamentales de la TBA en la profilaxis de la MC al inhibir el fenómeno de inflamación neurógena y la sensibilización neuronal. Otro mecanismo propuesto ha sido la disrupción de receptores y canales iónicos en la neurona aferente primaria<sup>204</sup> y por último, se ha hipotetizado que podría actuar directamente a nivel central a través de un transporte axonal retrogrado hacia neuronas de segundo orden<sup>205</sup>.

## **7.2. Onabot A en el tratamiento de migraña crónica.**

En el año 2005 se publicaron los primeros estudios en fase II sobre la eficacia de onabotA en la cefalea crónica diaria. Dichos estudios no demostraron eficacia en el objetivo primario (reducción de días con dolor) pero obtuvieron buenos datos de eficacia en alguno de los objetivos secundarios. Por otro lado, confirmaron la seguridad y buena tolerabilidad de la toxina en este grupo de pacientes. Esto permitió obtener datos acerca de qué tipo de pacientes, dosis y protocolo de inyección podía producir el mejor resultado para la profilaxis de la cefalea crónica<sup>206</sup>.

En 2008, un pequeño estudio controlado con placebo demostró que onabotA era eficaz y segura en el tratamiento de la MC sin abuso de medicación<sup>207</sup>. Sin embargo, los datos definitivos que confirmaron la eficacia de la onabotA en la MC corresponden al ensayo clínico PREEMPT (Phase III Research Evaluating Migraine Prophylaxis Therapy) que se publicó en el año 2010. Dicho ensayo comprendía dos estudios multicéntricos en fase III (PREEMPT 1 y 2) en los que se administró onabotA (155-195 U) en pacientes adultos con MC<sup>208,209</sup>. En total, ambos estudios incluyeron 1384 pacientes con MC sin profilaxis concurrente. Del total de pacientes, dos tercios cumplían criterios de abuso de medicación, y aproximadamente dos tercios habían recibido, antes de entrar en el estudio, tratamiento profiláctico que habían suspendido por ineficacia o intolerancia. El análisis combinado de ambos estudios mostró la superioridad de onabotA frente al placebo en prácticamente la totalidad de los parámetros analizados. La onabotA redujo significativamente la frecuencia media de días de dolor de cabeza en comparación con placebo y los episodios de dolor de cabeza. La publicación de los resultados del programa PREEMPT avaló el papel de onabotA en el tratamiento de la MC y, de hecho, fueron estos estudios los que llevaron a la aprobación de la onabotA en esta indicación por parte de la agencia europea y americana del medicamento.



## **II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**



Por todo lo expuesto podemos concluir que el CGRP es el neuropéptido para el que disponemos más evidencia en cuanto a su implicación directa en la fisiopatología de la migraña, habiéndose demostrado la elevación de sus niveles en sangre yugular y periférica en el seno de una crisis de migraña. Si consideramos a la MC como un estado de activación permanente o casi permanente del STV, parecería lógico plantearse que los niveles de CGRP pudieran encontrarse elevados en sangre periférica incluso fuera de las crisis de dolor en pacientes con MC. Por otro lado si el CGRP realmente estuviera elevado en pacientes con MC y teniendo en cuenta que onabotA es el único tratamiento con eficacia probada en la MC, sus niveles deberían, por un lado predecir la respuesta al tratamiento y, por otro, disminuir tras la respuesta exitosa al mismo.

Los objetivos concretos de esta trabajo fueron, por tanto:

1. Determinar la validez de CGRP en sangre periférica como posible biomarcador de MC.
2. Determinar la posible relación entre los niveles de CGRP en sangre periférica en MC y la respuesta al tratamiento preventivo con onabotA.
3. Determinar la existencia de una relación entre la variación en los niveles de CGRP en sangre periférica de pacientes con MC y la respuesta clínica al tratamiento con onabotA.





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.**

### **1.1. Pacientes.**

Se evaluaron de forma consecutiva todos los pacientes con criterios de MC, según la clasificación ICHD-III $\beta$ <sup>1</sup>, que acudieron a la Consulta de Cefaleas del Servicio de Neurología del Hospital Central de Asturias (HUCA) entre octubre de 2012 y junio de 2014.

Con el objetivo de optimizar la clasificación de pacientes con MC, aquellos con criterios de cefalea por abuso de analgésicos, habían realizado tratamiento deshabitador, al menos una vez, durante un periodo mínimo de 2 meses.

### **1.2. Controles.**

1. Se evaluaron de forma consecutiva todos los pacientes con criterios de ME, según la clasificación actual ICHD-III $\beta$ <sup>1</sup>, que acudieron a la Consulta de Cefaleas del HUCA entre octubre de 2012 y junio de 2014.

2. Adicionalmente se reclutó otro grupo control formado por mujeres sanas (mayoritariamente estudiantes de medicina, residentes, enfermeras o médicos de nuestro hospital) con ausencia subjetiva de dolor de cabeza y que no tomaban medicación.

3. Finalmente se reclutó un grupo control formado por pacientes con criterios de cefalea en racimos episódica (CR), según la clasificación actual ICHD-III $\beta$ <sup>1</sup>, fuera de periodo sintomático.

## **2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

- Edad igual o mayor a 18 años.
- Exploración física sistémica y neurológica normales.
- Estudio de neuroimagen (resonancia magnética o tomografía computerizada) normal.
- Aceptación del consentimiento informado.

## **3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Consumo excesivo de alcohol.

- Antecedente de enfermedad del sistema nervioso central distinta a cefalea primaria.
- Enfermedades somáticas o psiquiátricas activas y graves.

#### **4. PROTOCOLO DE ESTUDIO.**

##### **4.1. Recogida de variables.**

Se recogieron de forma prospectiva los datos correspondientes de los participantes incluidos como pacientes y grupo control. Se incluyeron datos demográficos (edad, sexo), factores de riesgo vascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, tabaquismo, obesidad), antecedentes médicos (patología respiratoria, cardiopatía), características de la cefalea (frecuencia de las crisis, presencia de aura), tratamiento en el momento de inclusión (abuso de analgesia, antiinflamatorios no esteroideos, triptanes, opiáceos, ergóticos, betabloqueantes, flunarizina, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, amitriptilina, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, topiramato, zonisamida, valproato u otros tratamientos) y otras comorbilidades.

##### **4.2. Obtención de la muestra y procedimientos de laboratorio.**

Todas las muestras analizadas se obtuvieron en ausencia de dolor agudo moderado-grave y en el caso de que los pacientes no hubieran tomado ningún medicamento sintomático en las 24 horas previas. Por razones éticas, los pacientes continuaron con su tratamiento preventivo habitual.

La extracción se realizó en ayunas entre las 09:30 y 12:00 horas en nuestra consulta. Para ello se colocó a los participantes en posición de decúbito supino, obteniéndose una muestra sanguínea de la vena antecubital derecha.

La sangre recogida se dejó coagular, procediéndose inmediatamente a la separación del suero mediante centrifugado de 10 minutos a 2000g. Las alícuotas se almacenaron rápidamente a -80 °C hasta su análisis.

Los niveles séricos de CGRP se determinaron usando kits ELISA comerciales (USCN Life Science Inc., Hubei, China), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Los niveles de

absorción se midieron con un espectrofotómetro de BioRad (Hercules, CA, USA). El límite de detección del análisis para CGRP fue de 4,3 pg/ mL.

#### **4.3. Determinación de CGRP.**

- Para el estudio de CGRP como posible biomarcador de MC se utilizó una muestra homogénea compuesta por mujeres con criterios de MC.
- Para el estudio de CGRP como marcador de respuesta al tratamiento con onabotA en pacientes con MC se utilizó una muestra de pacientes con MC que incluía ambos sexos.

A todos los participantes se les realizó una determinación de niveles de CGRP en las 24-72 horas siguientes a su inclusión en el estudio, salvo que existiera presencia de dolor agudo. En ese caso se programaba una nueva extracción coincidente con un periodo libre de dolor.

Aquellos pacientes con MC incluidos en el estudio de respuesta a tratamiento con onabotA se les realizó determinaciones de CGRP adicionales: una previa al inicio del tratamiento y otra un mes después.

#### **4.4. Tratamiento con onabotA.**

De acuerdo con las guías de tratamiento actual, se consideraron candidatos a tratamiento con onabotA, pacientes con MC y fracaso terapéutico (por ineficacia y/o intolerancia) de al menos 2 fármacos preventivos con eficacia demostrada en la migraña y pertenecientes a diferentes grupos farmacológicos. Al menos inicialmente, y siempre y cuando lo tolerasen correctamente, todos los pacientes tratados con onabotA continuaron con su tratamiento preventivo previo con el objetivo de conseguir un efecto sinérgico.

La administración de onabotA se realizó de acuerdo con el protocolo PREEMPT, administrándose 155-195 unidades repartidas en 31-39 sitios de inyección. Todos los pacientes tratados con onabotA, recibieron al menos 2 ciclos consecutivos y separados 12 semanas.

#### **4.5. Evaluación de respuesta al tratamiento con onabotA.**

Para valorar la respuesta al tratamiento, los pacientes cumplimentaron un registro diario de cefaleas durante el trimestre previo a su inicio y a lo largo del periodo de seguimiento. Esta valoración se realizó de forma ciega, tanto de los participantes como de los neurólogos implicados en la misma, respecto a los resultados de las determinaciones de laboratorio.

De acuerdo con dicho registro, a efectos a comprobar la eficacia del tratamiento con onabotA, los pacientes se clasificaron como (clasificación A)

##### a) Pacientes respondedores:

- Moderados. Si cumplían las siguientes premisas:

1) Los episodios de cefalea moderada-grave de más de 4 horas (o más cortos si se trataron con medicamentos sintomáticos) se redujeron entre un 33%-66%.

2) Se obtuvo un beneficio subjetivo, en una escala visual de 0-100, del 33 al 66%.

- Excelentes. Si cumplían las siguientes premisas:

1) Los episodios de cefalea moderada-grave de más de 4 horas (o más cortos si se trataron con medicamentos sintomáticos) se redujeron > 66%.

2) Se obtuvo un beneficio subjetivo, en una escala visual de 0-100, > 66 %.

##### b) Pacientes no respondedores. Si cumplían una de las siguientes premisas:

1) Los episodios de cefalea moderada-grave de más de 4 horas (o más cortos si se trataron con medicamentos sintomáticos) se redujeron < 33%.

2) Se obtuvo un beneficio subjetivo, en una escala visual de 0-100, < 33%.

Posteriormente, con el objetivo de comprobar la variación de los niveles de CGRP en relación a la respuesta clínica al tratamiento con onabotA, los pacientes se clasificaron como (clasificación B):

##### a) Respondedor. Si se cumplían las siguientes premisas:

1. Los episodios de cefalea moderada-grave de más de 4 horas (o más cortos si se trataron con medicamentos sintomáticos) se redujeron > 50%.

2. Se obtuvo un beneficio subjetivo, en una escala visual de 0-100, > 50%.

##### b) No respondedor: cuando no se cumplía alguna de las premisas anteriores.

## **5. COMITE DE ÉTICA.**

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del H.U.C.A. y todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos obtenidos se han analizado con el programa gratuito R<sub>x</sub>64.3.1.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si su p-valor fue inferior al 5%,  $p < 0,05$  (nivel de significación,  $\alpha = 5\%$ )

### **6.1. Estadística descriptiva.**

Se procede en primer lugar a la descripción de la muestra:

- Las variables categóricas (sexo, factores de riesgo vascular, características de la cefalea, y tratamiento) se describen mediante frecuencias relativas y absolutas.
- Tras realizar el test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff y dada la simetría observada de la variable numérica edad, esta se describe mediante la media y la desviación estándar.
- Los niveles de CGRP se describen mediante la media, desviación estándar, mediana y rango intercuartil.

### **6.2. Relación entre variables.**

Para comparar los niveles de CGRP y las variables categóricas en los diferentes grupos se utilizaron, respectivamente, el clásico no paramétrico de Mann-Whitney y la prueba exacta de chi-cuadrado.

Para el análisis de los niveles de CGRP antes y después del tratamiento con onabotA y en respondedores contra no respondedores se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon pareado y no pareado. Para la determinación de los niveles de CGRP en el grupo de respuesta a onabotA se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para medir la capacidad de discriminación (MC vs. controles y CM vs ME) de los niveles de CGRP se obtuvo la curva característica operativa del receptor (ROC) y el área bajo la curva ROC (AUC).



El punto asociado con el índice de Youden se eligió como punto de corte. La banda de confianza para las curvas ROC y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) para el AUC y el umbral se calcularon por 10.000 iteraciones del método bootstrap. Por último, para comprobar la capacidad de diagnóstico de los criterios propuestos, se realizó el método de validación cruzada de dejar-uno-fuera.

## **IV. RESULTADOS**



## 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.

Durante el periodo de reclutamiento se identificaron 107 pacientes con MC que cumplieran los criterios de inclusión/exclusión y aceptaran participar en el estudio, de los cuales 103 eran mujeres, con una edad media de  $43,1 \pm 11,7$  años y con un tiempo medio en situación de cronicidad de  $9,5 \pm 8,4$  años.

Se reclutaron además, como controles con cefalea, 43 mujeres con ME con una edad media de  $44,4 \pm 11,6$  años. El grupo control de mujeres sin cefalea incluyó 31 participantes con una edad media de  $38,6 \pm 12,8$  años. Adicionalmente, se reclutó un grupo de 14 pacientes con CR (13 varones, edad media  $45,4 \pm 7,9$  años).

De las 103 mujeres con MC, un total de 46 (44,7%) tenían historia de migraña con aura, aunque de ellas, sólo 4 (8,6%) habían experimentando un episodio de aura al menos una vez al mes en el año anterior. En la muestra de mujeres con ME, 21 (48,8%) tenían antecedentes de aura.

Al comparar nuestra muestra de pacientes con MC frente al grupo de pacientes con ME no se objetivaron diferencias significativas relativas a la edad o a la prevalencia historia de aura entre ambos grupos. En relación al resto de variables recogidas, se objetivaron diferencias significativas en la prevalencia de comorbilidades (depresión) y utilización de tratamiento sintomático (AINES y triptanes) y preventivo (topiramato, zonisamida, amitripitilina, IECAs y politerapia) tal y como se refleja en la tabla 1:

Tabla 1. Comparación de características entre pacientes con MC y ME

|                              | Migraña crónica (n=103) | Migraña episódica (n=43) | p                |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| Edad                         | 43,1 ± 11,7             | 44,4 ± 11,6              | 0,514            |
| Aura (n,%)                   | 46 (44,7%)              | 21 (48,8%)               | 0,91             |
| Hipertensión arterial        | 15 (14,6%)              | 4 (9,3%)                 | 0,23             |
| Hipercolesterolemia          | 19 (18,5%)              | 6 (13,9%)                | 0,486            |
| Tabaquismo                   | 15 (14,6%)              | 8 (18,6%)                | 0,668            |
| Depresión                    | 52 (50,5%)              | 6 (13,9%)                | <b>&lt;0,001</b> |
| Fibromialgia                 | 13 (12,6%)              | 1 (2,3%)                 | 0,05             |
| Obesidad                     | 6 (5,8%)                | 1 (2,3%)                 | 0,354            |
| AINES                        | 74 (71,8%)              | 21 (48,8%)               | <b>0,008</b>     |
| Triptanes                    | 76 (73,8%)              | 22 (51,1%)               | <b>0,007</b>     |
| Abuso de analgésicos         | 26 (25,2%)              | 1 (2,3%)                 | <b>&lt;0,001</b> |
| Topiramato                   | 52 (50,5%)              | 9 (20,9%)                | <b>0,001</b>     |
| Beta-Bloqueantes             | 24 (23,3%)              | 8 (18,6%)                | 0,081            |
| Flunarizina                  | 1 (0,97%)               | 1 (2,3%)                 | 0,533            |
| Amitriptilina                | 34 (33%)                | 5 (11,6%)                | <b>0,007</b>     |
| ISRSs                        | 12 (11,7%)              | 2 (4,6%)                 | 0,231            |
| IECAs                        | 23 (22,3%)              | 3 (6,9%)                 | <b>0,032</b>     |
| Zonisamida                   | 13 (12,6%)              | 0 (0%)                   | <b>0,010</b>     |
| Ácido Valproico              | 6 (5,8%)                | 3 (6,9%)                 | 0,818            |
| Politerapia (≥2 preventivos) | 58 (56,3%)              | 6 (13,9%)                | <b>&lt;0,001</b> |

## 2. NIVELES DE CGRP.

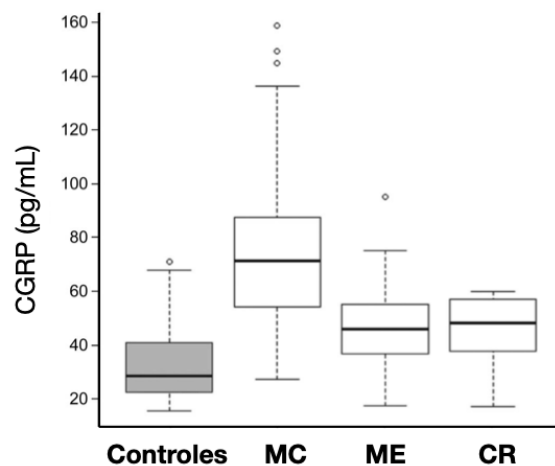
### 2.1. Determinación de niveles de CGRP en los distintos grupos.

- Los niveles de CGRP obtenidos en el grupo de pacientes con MC fueron  $74,90 \pm 28,29$  pg/mL (límites 29,0-157,72). En el subgrupo de pacientes con MC e historia de aura los niveles obtenidos de CGRP fueron  $81,29 \pm 27,11$  pg/mL (límites 27,44-148,39) mientras que entre aquellas con MC sin aura fueron de  $69,65 \pm 28,39$  pg/mL (límites 29,0-157,7).
- Los niveles de CGRP obtenidos en el grupo de pacientes con ME fueron  $46,37 \pm 15,21$  pg/mL (límites 17,55-94,73). En el subgrupo de pacientes con MA los niveles obtenidos fueron de  $48,73 \pm 12,82$  pg/mL (límites 22,7-77,0). En el subgrupo de MO estos niveles fueron de  $44,12 \pm 17,18$  pg/mL (límites 17,6-94,7).
- En el grupo control de pacientes con CR los niveles de CGRP fueron de  $45,87 \pm 12,32$  pg/mL (límites 16,41-63,56)
- En el grupo control de pacientes sin cefalea los niveles de CGRP fueron de  $33,74 \pm 16,10$  pg/mL (límites 15,53-70,75).

### 2.2. Comparación de niveles de CGRP entre los diferentes grupos.

Al comparar los niveles de CGRP se objetivaron diferencias significativas entre los distintos grupos tal y como se muestra en la figura 6:

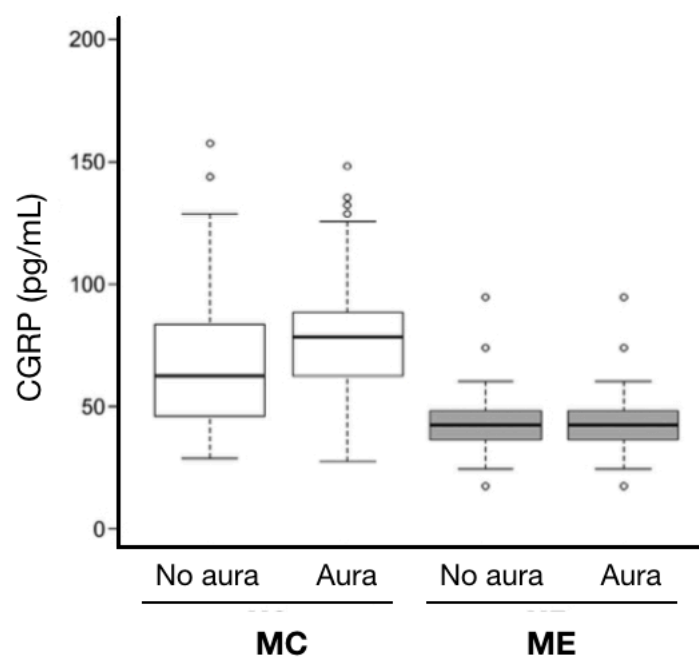
Figura 6. Comparación de niveles de GCRP entre los grupos



- Los niveles de CGRP fueron significativamente más altos en mujeres con MC comparados con el grupo de mujeres con ME ( $p < 0,001$ ), con el grupo control sin cefalea y con el grupo control de pacientes con CR ( $p < 0,001$ ).
- Los niveles de CGRP en el grupo de ME fueron significativamente más altos que en el grupo control de pacientes sin cefalea ( $p < 0,005$ ).

Si comparamos los niveles de CGRP en función de la historia de aura se obtuvieron los siguientes resultados (fig. 7):

Figura 7. Comparación de niveles de CGRP en función del aura



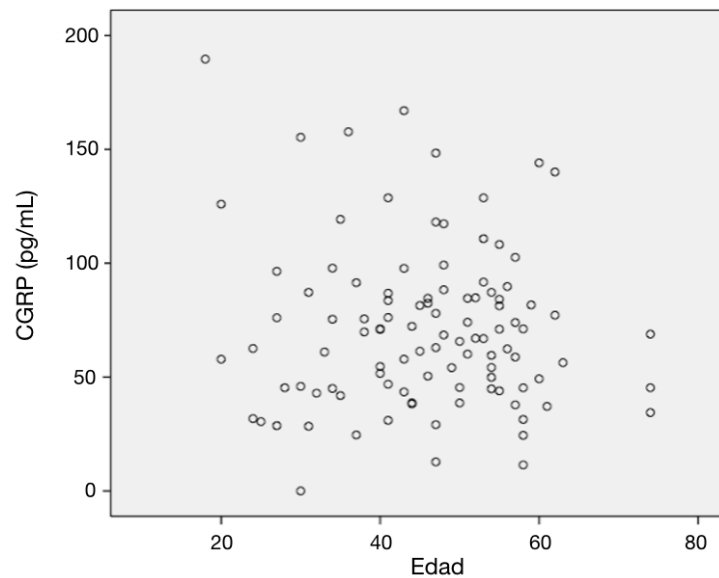
- Los niveles de CGRP fueron significativamente más altos en mujeres con MC con aura comparados con el grupo de mujeres con MC sin aura ( $p < 0,05$ ).
- En ME no se identificaron diferencias significativas en función de la presencia de aura ( $p > 0,05$ ).

### 2.3. Comparación de niveles de CGRP entre pacientes con MC.

El análisis de los niveles de CGRP entre las pacientes con MC, en función de las variables recogidas mostró los siguientes resultados:

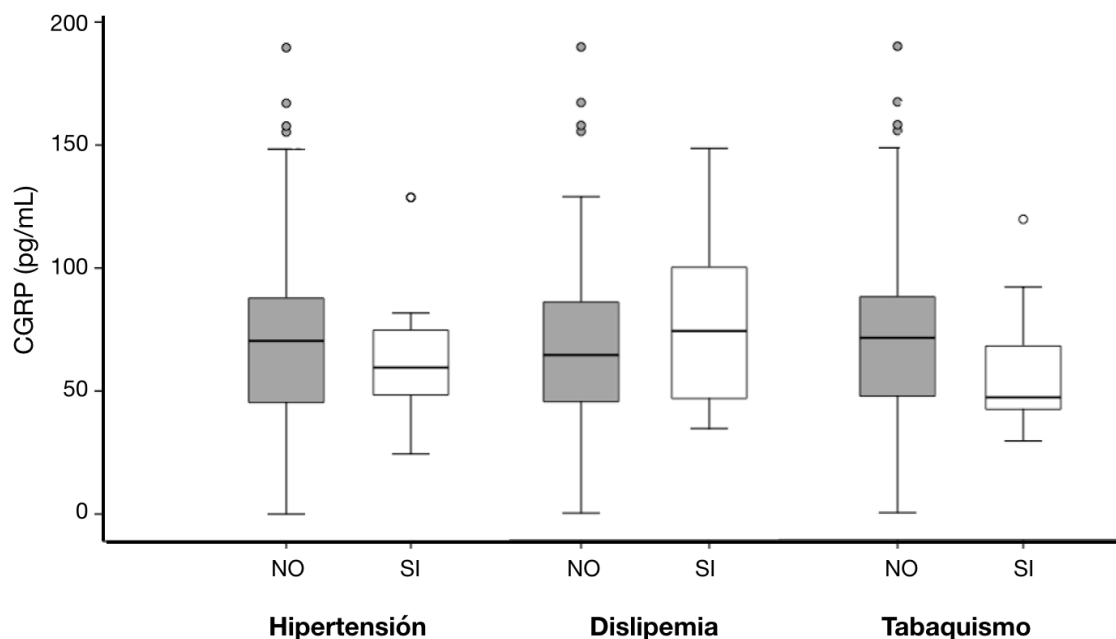
- Los niveles de CGRP no se encontraban influenciados por la edad de las pacientes (fig. 8) en los límites etarios de nuestra serie.

Figura 8. Relación entre niveles de GCRP y edad



- La presencia de aura se correlacionó con un aumento significativo de los niveles de CGRP [MC con aura  $81,29 \pm 27,11$  pg/mL (límites 27,44-148,39) vs MC sin aura  $69,65 \pm 28,39$  pg/mL (límites 29,0-157,7 pg/mL);  $p = 0,013$ ]. (fig. 2)
- Los niveles de CGRP en MC no se modificaron significativamente en relación con la presencia de factores de riesgo vascular como hipertensión, dislipemia o tabaquismo ( $p > 0,05$ ) (fig. 9).

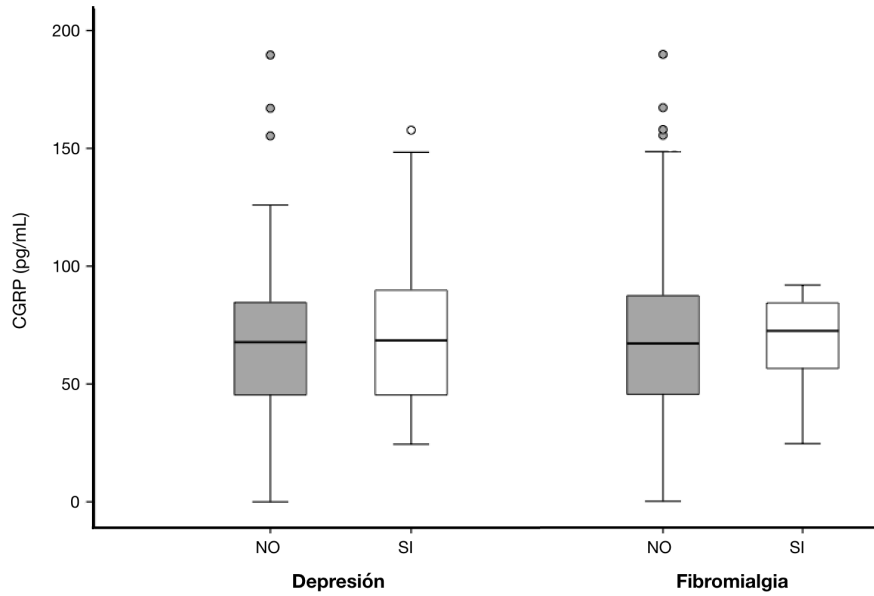
Figura 9. Niveles de CGRP en función factores de riesgo vascular





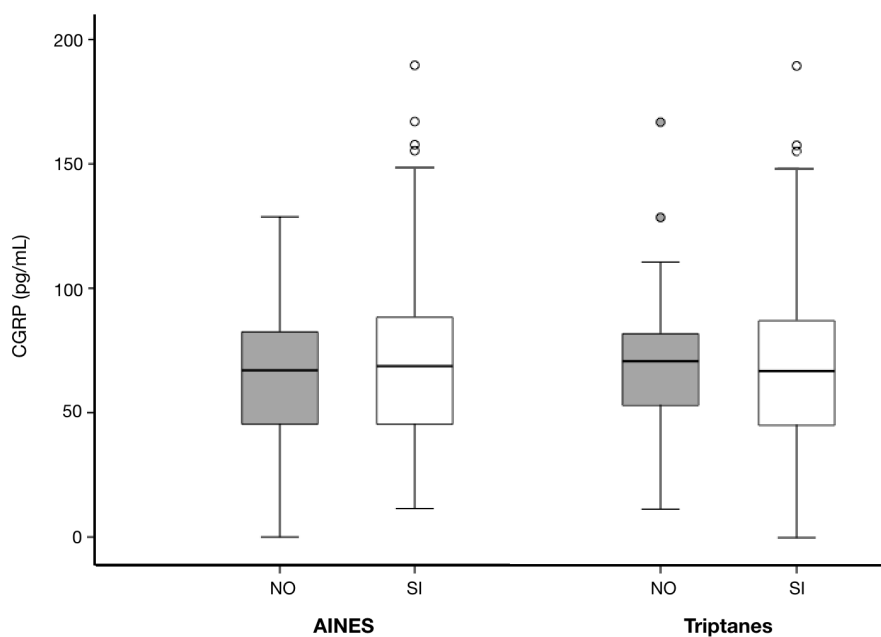
- No se identificaron diferencias en los niveles de CGRP asociados a la presencia de comorbilidades como depresión o fibromialgia (fig. 10).

Figura 10. Niveles de CGRP en función de comorbilidades



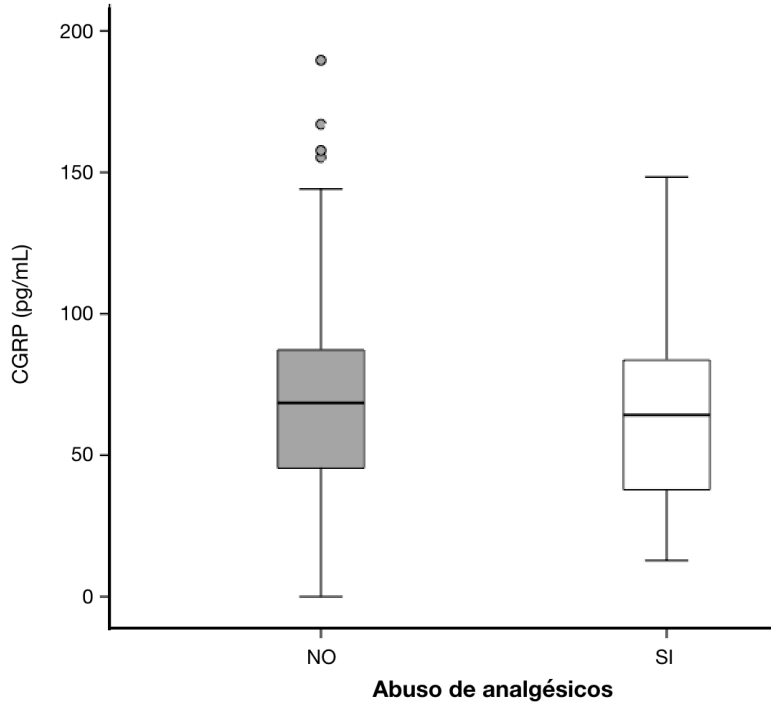
- Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CGRP entre los pacientes en tratamiento sintomático con AINES o triptanes en comparación con aquellos que no los tomaban ( $p > 0,05$ ) (fig. 11).

Figura 11. Niveles de CGRP en función de tratamiento sintomático



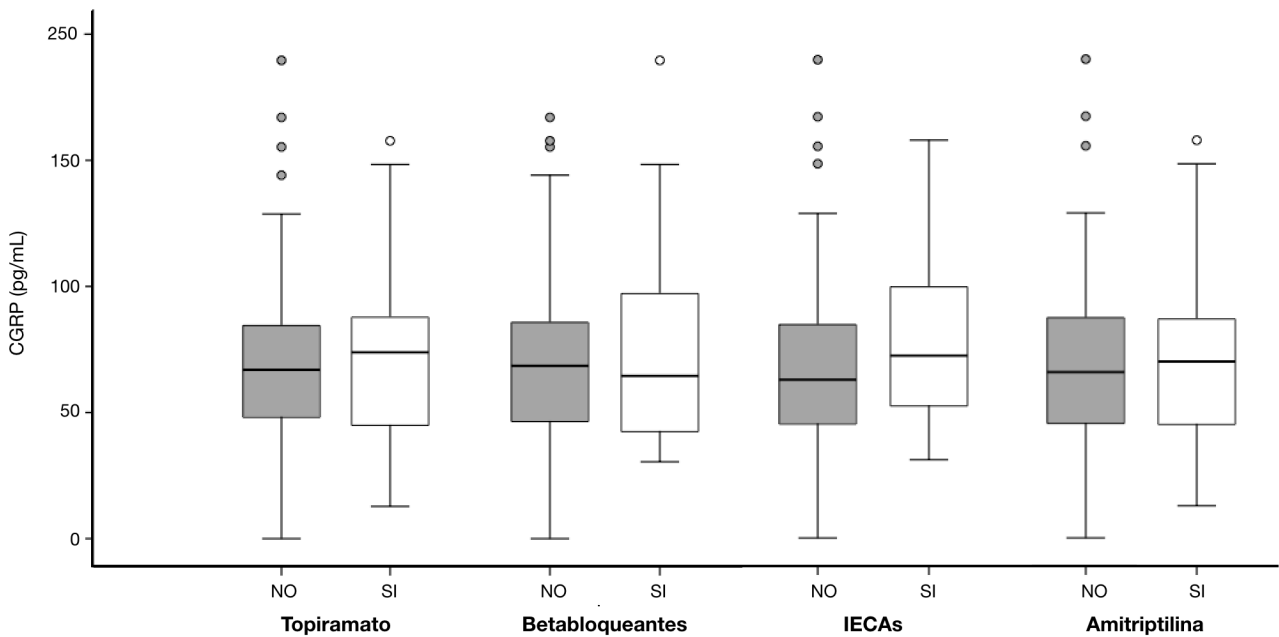
- Los niveles de CGRP no difirieron entre aquellas pacientes que cumplían criterios de abuso de analgésicos comparadas con aquellas sin abuso ( $p > 0,05$ ) (fig. 12).

Figura 12. Niveles de CGRP en función de abuso de analgésicos



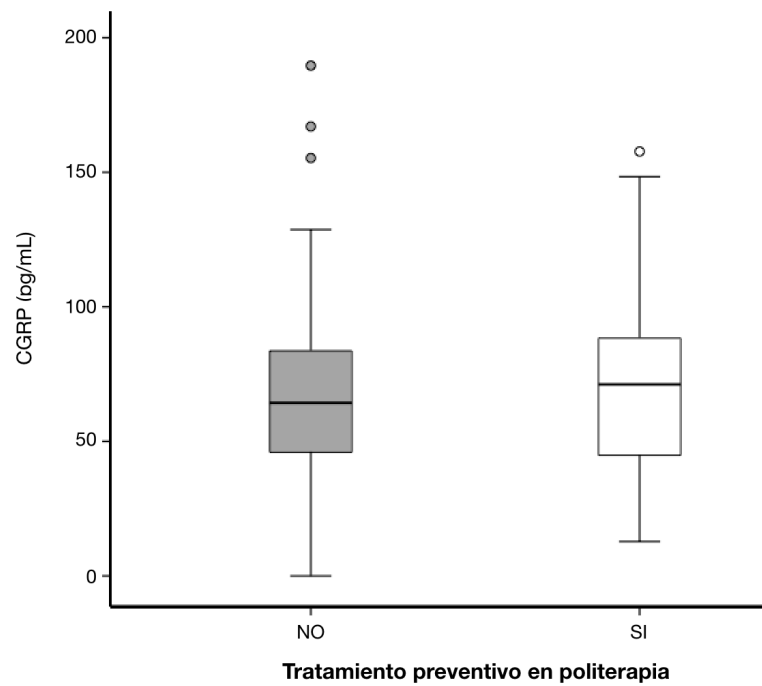
- Los niveles de CGRP no se influyeron de manera significativa en función del empleo de los distintos fármacos preventivos analizados ( $p > 0,05$ ) (fig. 13).

Figura 13. Niveles de CGRP en función de tratamientos preventivos



- Los niveles de CGRP de pacientes en tratamiento preventivo en monoterapia y de pacientes que recibían tratamiento preventivo con politerapia no variaban de manera significativa ( $p > 0,05$ ) (fig. 14).

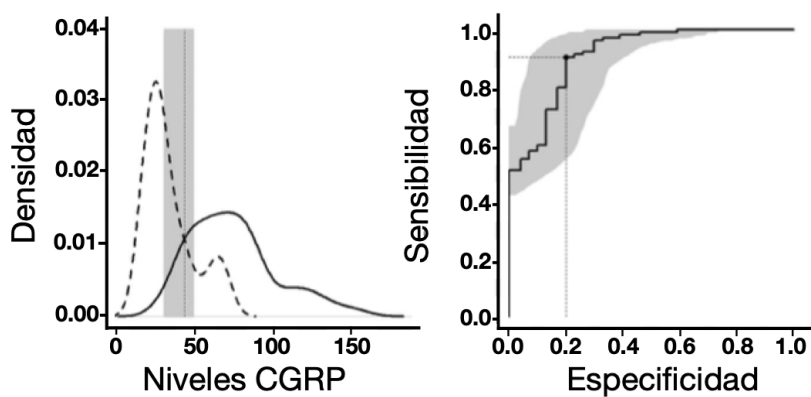
Figura 14. Niveles de CGRP en función de politerapia preventiva.



### 3. NIVELES DE CGRP COMO MARCADOR DE MIGRAÑA

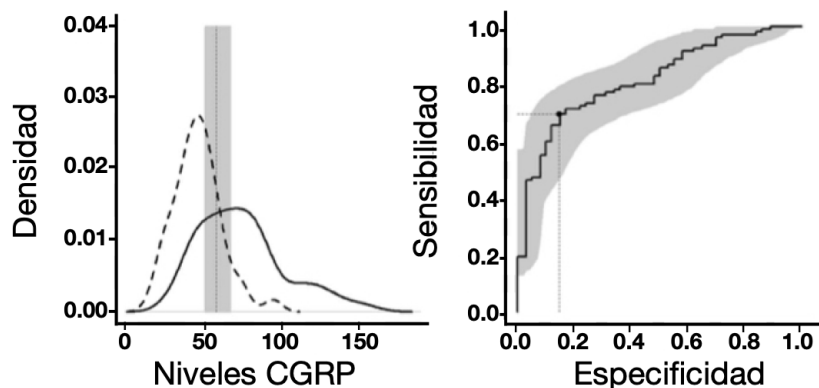
- Para discriminar entre MC y controles sin cefalea, el punto de corte óptimo se alcanzó con una concentración de CGRP de 43,45 pg/mL (IC 95% bootstrap: 30,91-49,06) con un área bajo la curva de 0,912 (IC 95% bootstrap: 0,8499-0,9640). Para este punto de corte, el 90,38% de las pacientes con MC y el 80,64% de los controles se encontraban correctamente clasificados (fig. 15).

Figura 15. Punto de corte entre MC y controles sin cefalea



- Para diferenciar entre MC y ME, el punto de corte óptimo se alcanzó con una concentración de CGRP de 58,22 pg/mL (IC 95% bootstrap: 51,31-67,09). Para este punto de corte el 85,7% de pacientes con MC y el 69,23% de pacientes con ME se encuentran correctamente clasificados (fig. 16).

Figura 16. Punto de corte entre MC y ME



#### 4. CGRP Y TRATAMIENTO CON ONABOTA EN MIGRAÑA CRÓNICA

Del total de pacientes con criterios de MC, 83 (edad media 44,2±12,0, varones 6%) recibieron tratamiento con onabotA de acuerdo con el protocolo descrito con anterioridad. Las características de estos pacientes se describen en la tabla 2.

Tabla 2: Descripción de las MC tratados con onabotA

| <b>Tratados con onabotA (n=83)</b>  |               |
|-------------------------------------|---------------|
| <b>Varones (n,%)</b>                | 4 (4,9%)      |
| <b>Edad</b>                         | 44,16 ± 11,98 |
| <b>Aura (n,%)</b>                   | 36 (43,4%)    |
| <b>Hipertensión arterial</b>        | 9 (10,8%)     |
| <b>Hipercolesterolemia</b>          | 16 (19,3%)    |
| <b>Tabaquismo</b>                   | 8 (9,6%)      |
| <b>Depresión</b>                    | 43 (51,8%)    |
| <b>Fibromialgia</b>                 | 10 (12%)      |
| <b>Obesidad</b>                     | 4 (4,9%)      |
| <b>AINES</b>                        | 55 (66,3%)    |
| <b>Triptanes</b>                    | 66 (79,5%)    |
| <b>Abuso de analgésicos</b>         | 26 (31,3%)    |
| <b>Beta-Bloqueantes</b>             | 22 (26,5%)    |
| <b>Amitriptilina</b>                | 24 (28,9%)    |
| <b>ISRSs</b>                        | 12 (14,5%)    |
| <b>IECAs</b>                        | 19 (22,9%)    |
| <b>Topiramato</b>                   | 37 (44,6%)    |
| <b>Zonisamida</b>                   | 12 (14,5%)    |
| <b>Ácido Valproico</b>              | 9 (10,8%)     |
| <b>Politerapia (≥2 preventivos)</b> | 50 (60,2%)    |

#### 4.1. Niveles de CGRP en pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con onabotA.

##### Según clasificación de respuesta a tratamiento tipo A.

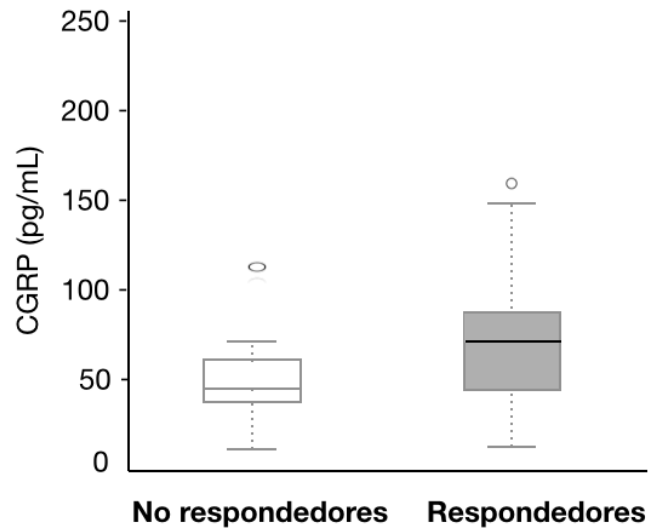
- En relación a la respuesta clínica, 61 pacientes (75,3%) respondieron al tratamiento mientras que los 20 restantes (24,7%) se clasificaron como no respondedores.
- La comparación entre respondedores y no respondedores a onabotA no mostró diferencias relativas a las características demográficas, características clínicas, historia de aura, enfermedades asociadas (depresión, fibromialgia, hipertensión arterial y obesidad), medicación aguda (AINES, triptanes), abuso de analgésicos ni en relación al fármaco o número de tratamientos preventivos indicados (monoterapia versus politerapia) (tabla 3)

Tabla 3: Comparación de pacientes con MC en función de respuesta al tratamiento según clasificación A

|                              | No respondedores (n=20) | Respondedores (n=61) | p     |
|------------------------------|-------------------------|----------------------|-------|
| Varones (n,%)                | 1 (5%)                  | 3 (4,91%)            | 0,124 |
| Edad                         | 42,28 ± 11,22           | 44,02 ± 12,17        | 0,487 |
| Aura (n,%)                   | 8 (40%)                 | 26 (42,6%)           | 0,201 |
| Hipertensión arterial        | 3 (15%)                 | 8 (13,1%)            | 0,268 |
| Hipercolesterolemia          | 4 (20%)                 | 15 (24,6%)           | 0,475 |
| Tabaquismo                   | 3 (15%)                 | 7 (11,4%)            | 0,312 |
| Depresión                    | 8 (40%)                 | 34 (55,7%)           | 0,218 |
| Fibromialgia                 | 2 (10%)                 | 8 (13,1%)            | 0,373 |
| Obesidad                     | 2 (10%)                 | 5 (8,2%)             | 0,169 |
| AINES                        | 14 (70%)                | 40 (65,6%)           | 0,354 |
| Triptanes                    | 10 (50%)                | 48 (78,6%)           | 0,102 |
| Abuso de analgésicos         | 6 (30%)                 | 20 (32,7%)           | 0,529 |
| Beta-Bloqueantes             | 2 (20%)                 | 13 (21,3%)           | 0,821 |
| Amitriptilina                | 8 (40%)                 | 22 (32,7%)           | 0,617 |
| ISRSs                        | 2 (10%)                 | 10 (16,4%)           | 0,567 |
| IECAs                        | 5 (25%)                 | 15 (24,6%)           | 0,901 |
| Topiramato                   | 7 (35%)                 | 27 (44,2%)           | 0,176 |
| Zonisamida                   | 3 (15%)                 | 12 (19,6%)           | 0,363 |
| Ácido Valproico              | 2 (10)                  | 5 (8,2%)             | 0,417 |
| Politerapia (≥2 preventivos) | 10 (50%)                | 40 (65,5%)           | 0,203 |

- Antes del tratamiento, los niveles de CGRP en los respondedores (70,4 pg/mL) fueron significativamente más elevados que los observados en el grupo de pacientes no respondedores (48,3 pg/mL;  $p < 0,001$ ) (fig. 17).

Figura 17. Niveles de CGRP previos al tratamiento en respondedores y no respondedores según clasificación A



### Según clasificación de respuesta a tratamiento tipo B.

- En relación a la respuesta clínica, 64 pacientes (77,1%) respondieron al tratamiento mientras que los 19 restantes (22,9%) se clasificaron como no respondedores.
- La comparación entre respondedores y no respondedores a onabotA no mostró diferencias relativas a las características demográficas, características clínicas, historia de aura, enfermedades asociadas (depresión, fibromialgia, hipertensión arterial y obesidad), medicación aguda (AINES, triptanes), abuso de analgésicos ni en relación al fármaco o número de tratamientos preventivos indicados (monoterapia versus politerapia) (tabla 4)

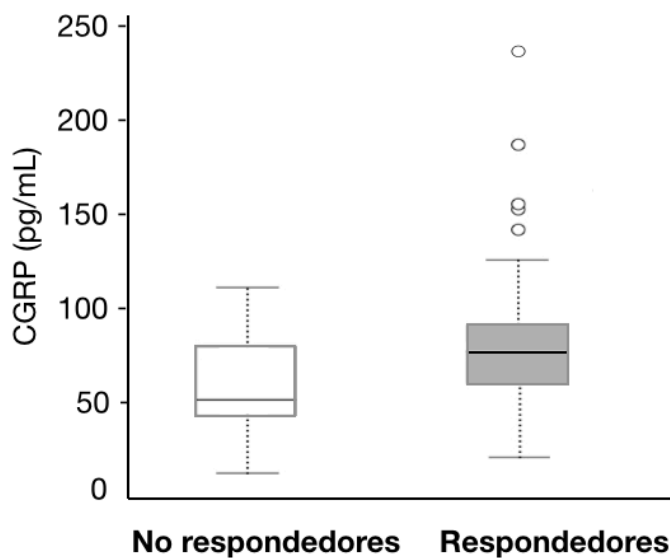
Tabla 4: Comparación de pacientes con MC en función de respuesta al tratamiento según clasificación B

|                              | No respondedores (n=19) | Respondedores (n=64) | p     |
|------------------------------|-------------------------|----------------------|-------|
| <b>Varones (n,%)</b>         | 1 (5,2%)                | 3 (4,6%)             | 0,887 |
| <b>Edad</b>                  | 42,10 ± 11,75           | 44,78 ± 12,07        | 0,865 |
| <b>Aura (n,%)</b>            | 8 (42,1%)               | 28 (43,8%)           | 0,899 |
| <b>Hipertensión arterial</b> | 2 (10,5%)               | 7 (10,9%)            | 0,969 |
| <b>Hipercolesterolemia</b>   | 2 (10,5%)               | 14 (21,9%)           | 0,271 |

|                                     | No respondedores (n=19) | Respondedores (n=64) | p     |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------------|-------|
| Tabaquismo                          | 3 (15,8%)               | 5 (7,8%)             | 0,301 |
| Depresión                           | 9 (47,4%)               | 34 (53,1%)           | 0,659 |
| Fibromialgia                        | 2 (10,5%)               | 8 (12,5%)            | 0,816 |
| Obesidad                            | 2 (10,5%)               | 2 (3,1%)             | 0,186 |
| AINES                               | 11 (57,9%)              | 44 (68,8%)           | 0,152 |
| Triptanes                           | 13 (68,4%)              | 53 (82,8%)           | 0,112 |
| Abuso de analgésicos                | 6 (31,6%)               | 20 (31,2%)           | 0,179 |
| Beta-Bloqueantes                    | 4 (21,1%)               | 18 (28,1%)           | 0,161 |
| Amitriptilina                       | 6 (31,6%)               | 18 (28,1%)           | 0,166 |
| ISRSs                               | 2 (10,5%)               | 10 (15,6%)           | 0,163 |
| IECAs                               | 4 (21,1%)               | 15 (23,4%)           | 0,181 |
| Topiramato                          | 7 (36,8%)               | 30 (46,9%)           | 0,153 |
| Zonisamida                          | 2 (10,5%)               | 10 (15,6%)           | 0,163 |
| Ácido Valproico                     | 2 (10,5%)               | 7 (10,9%)            | 0,182 |
| Politerapia ( $\geq 2$ preventivos) | 10 (52,6%)              | 40 (62,5%)           | 0,158 |

- Antes del tratamiento, los niveles de CGRP en los respondedores (76,85 pg/mL) fueron significativamente más elevados que los observados en el grupo de pacientes no respondedores (50,45 pg/mL;  $p < 0,001$ ) (fig. 18).

Figura 18. Niveles de CGRP previos al tratamiento en respondedores y no respondedores según clasificación B

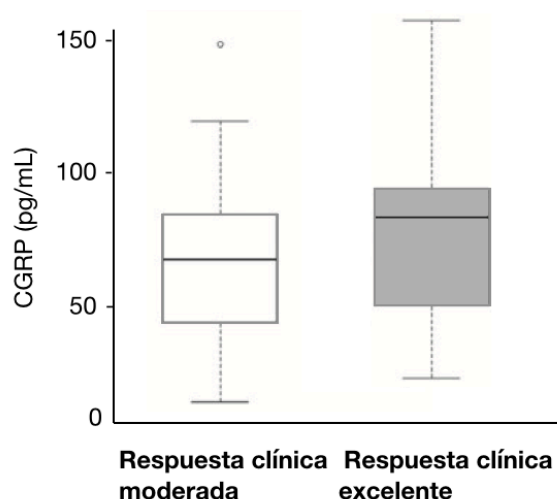




#### 4.2. Niveles de CGRP como predictor del grado de respuesta clínica a tratamiento con onabotA.

- Los niveles de CGRP previos al tratamiento con onabotA en pacientes con respuesta clínica moderada fueron de  $66,1 \pm 28,9$  pg/mL, límites 12,8-158,4.
- En aquellos con respuesta clínica excelente, los niveles de CGRP fueron de  $79,2 \pm 36,6$ , límites 22,0- 157,7.
- Aunque numéricamente los niveles de CGRP entre los pacientes con respuesta clínica excelente fueron superiores a los que presentaban aquellos con respuesta clínica moderada, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ) (fig. 19)

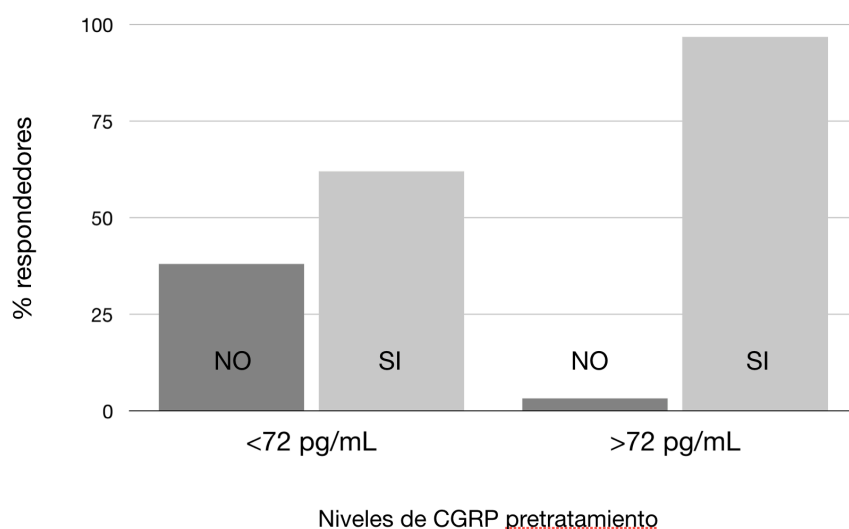
Figura 19. Niveles de CGRP en pacientes con respuesta clínica a onabotA moderada y excelente



#### 4.3. Niveles de CGRP como predictor de la respuesta a tratamiento con onabotA

- Para la discriminación entre respondedores y no respondedores el punto de corte óptimo se alcanzó con una concentración de CGRP de 72 pg/mL con un AUC de 0,714 (IC 95% bootstrap 0,594-0,833). Este nivel de CGRP clasificaría correctamente el 49,2% de los respondedores y el 95,0% de los no respondedores (fig. 20).

Figura 20. Capacidad discriminatoria de CGRP

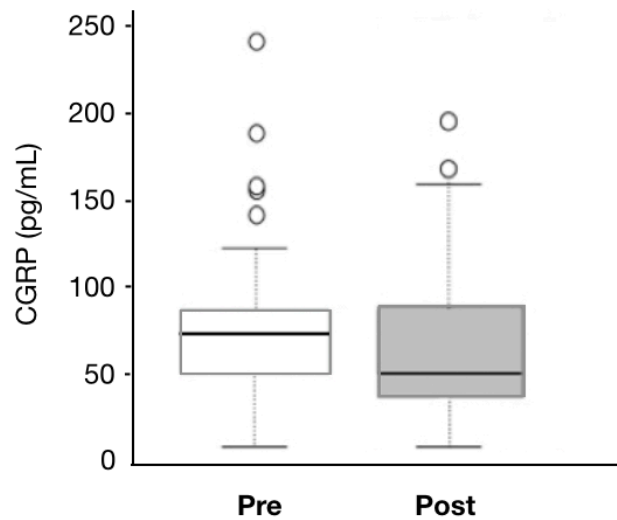


- La probabilidad de responder a onabotA en los pacientes con MC fue 28 veces mayor (OR 18,39) cuando el nivel de CGRP previo al tratamiento era mayor de 72 pg/mL.
- Si consideramos el nivel de CGRP como una variable continua, el OR resultante es de 1,032 (IC 95% 1,008-1,056) por lo que para cada unidad (pg/mL) de CGRP, la probabilidad de que un paciente responda al tratamiento aumenta 3,2 %.

#### 4.4. Variación de los niveles de CGRP en respuesta al tratamiento con onabotA.

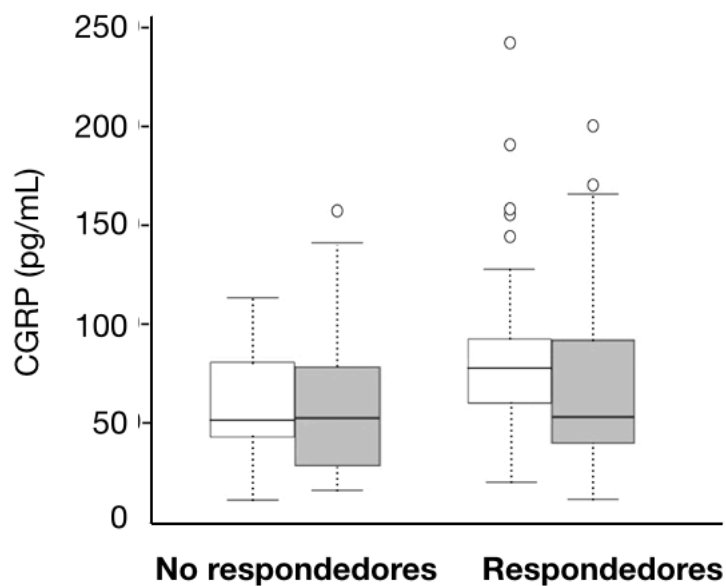
- Los niveles de CGRP previos al tratamiento con onabotA fueron de 74,09 pg/mL (límites 241,0-11,4).
- Tras el tratamiento los niveles de CGRP fueron de 51,89 pg/mL (límites 199,4-10,2).
- La comparación de niveles de CGRP pre y post-tratamiento mostró una reducción significativa de los mismos, con decremento de las medianas de 22,2 (IC 95%: 11,05-30,54;  $p < 0,001$ ) (fig. 21).

Figura 21. Niveles de CGRP en MC antes y después del tratamiento con onabotA



- Un mes después del tratamiento, los niveles de CGRP no se modificaron de manera significativa entre los no respondedores (51,89 pg/mL), con un decremento de medianas de -1,44 (IC 95% -15,15-25,24;  $p > 0,05$ ). Sin embargo, entre los respondedores, los niveles de CGRP tras el tratamiento (52,48 pg/mL) habían disminuido significativamente, con un decremento de medianas de -24,4 (IC 95% 13,6-33,7,  $p = 0,003$ ) (fig. 22).

Figura 22. Comparación de niveles de CGRP tras un mes de tratamiento



## **V. DISCUSIÓN**



El objetivo principal de esta tesis doctoral no fue otro que intentar buscar un biomarcador para la MC, la variante sin duda más invalidante de la migraña. Una primera pregunta que podríamos hacernos sería si realmente necesitamos un biomarcador para una entidad como la migraña, o su variante MC, de diagnóstico clínicamente sencillo en la inmensa mayoría de los casos. Hay múltiples argumentos que apoyan la idea que para el caso de la migraña o de la MC, al igual que ocurre en otras entidades neurológicas, es necesario disponer de un biomarcador fiable. De entrada, si realmente dispusiésemos de un biomarcador para la MC, ésta sería inmediatamente considerada con sólidas bases biológicas, algo que no ocurre actualmente. Además, hoy en día se sabe que alrededor de un 10% de los pacientes que diagnosticamos como MC tienen en realidad otras cefaleas, tales como cefalea tensional crónica, cefalea cervicogénica o cefalea por trastornos de la presión de líquido cefalorraquídeo, por poner solo algunos ejemplos prácticos. Siguiendo con los argumentos, dado que el diagnóstico de la migraña o de la MC es totalmente subjetivo al estar basado exclusivamente en la anamnesis al paciente, disponer de un biomarcador nos permitiría asegurar este diagnóstico y lo mismo ocurriría con el seguimiento de la respuesta a los tratamientos, que en el momento actual reside en la opinión subjetiva del paciente y de su colaboración a la hora de rellenar los calendarios de crisis de migraña. Piénsese, por ejemplo, lo que supondría, tanto en la inclusión de pacientes como para el seguimiento objetivo en de los resultados, disponer de un biomarcador fiable en los ensayos clínicos. Por consiguiente, pensamos que la existencia de un biomarcador sería de enorme utilidad, de cara a la práctica clínica y a la investigación de la migraña y de la MC.

No tuvimos muchas dudas a la hora de elegir el CGRP como posible biomarcador de MC. Ya desde hace más de 20 años Lars Edvinsson y Peter Goadsby demostraron que este péptido era el único que se encontraba consistentemente elevado durante las crisis de migraña<sup>159</sup>. El problema de este importante trabajo fue que los autores pensaban que era necesario extraer sangre de la vena yugular externa ipsilateral al dolor para demostrar este aumento pues pensaban que la posible elevación del CGRP se diluiría en la sangre periférica. Sin duda, la demostración a principios de esta década por el grupo de Leira y colaboradores que los niveles de CGRP aumentaban también en sangre periférica extraída de la vena cubital contribuyó enormemente a impulsar nuestro interés en este posible biomarcador<sup>162</sup>. Múltiples evidencias indican que en la MC existe un estado de sensibilización permanente de las vías centrales responsables de la fisiopatología del dolor migrañoso, como queda reflejado en la habitual presencia de alodinia en esta entidad<sup>180</sup>. Pues bien,

diversos trabajos han puesto de manifiesto que en modelos experimentales el CGRP es una molécula crucial en el desarrollo o fisiopatología de este fenómeno de sensibilización central responsable de la cronificación de la migraña<sup>192</sup>. Si a todo esto unimos la demostración de que la inyección de CGRP en humanos es capaz de inducir una cefalea que remeda a la migraña<sup>170</sup>, podemos concluir que cuando iniciamos este trabajo la elección del CGRP era obvia.

Un biomarcador como tal de una enfermedad, además de estar elevado (o disminuido) en relación a los controles sin dicha patología, debe de ser capaz de predecir la respuesta a su tratamiento específico y variar en relación directa con la administración de este tratamiento (piénsese en la glucemia y la insulina en la diabetes) y ese fue planteamiento global de este trabajo.

## **1. CGRP COMO BIOMARCADOR DE MC.**

El principal hallazgo de este trabajo es la elevación interictal, en sangre periférica, de los niveles de CGRP en nuestra muestra de pacientes con MC en comparación con los pacientes con ME y con el grupo control. De manera paralela, los niveles de CGRP en mujeres con ME se encontraban significativamente elevados en relación con el grupo de mujeres sin cefalea. Algo similar ocurrió con el otro brazo control de pacientes con CR sin brote. La fisiopatología de la MC y los mecanismos exactos que conducen a la transformación de ME a MC no se conocen con certeza. Sin embargo, el incremento de los niveles de CGRP en sangre periférica pueden ser interpretados como un marcador a distancia de la activación del STV y confirmaría nuestra hipótesis de que en la MC existe una activación permanente o casi permanente del STV que sería medible en sangre periférica.

Hasta la fecha son pocos los estudios publicados en los que se había analizado los niveles de CGRP en migraña, presentando además resultados contradictorios. En 3 estudios se analizaron los niveles de CGRP, durante el ataque agudo de migraña, en la vena yugular. Mientras que en 2 trabajos se detectó un aumento de los niveles de CGRP<sup>159,163</sup>, que además era revertido tras la administración de triptanes, otro estudio no demostró aumento de los niveles de CGRP<sup>164</sup>. En este estudio con resultados negativos, se consideró que la demora entre la obtención de la muestra y su procesado justificó los resultados ya que el investigador visitaba y obtenía las muestras en casa de los participantes. Debido a las dificultades para obtener muestras de vena yugular, otros grupos han determinado los niveles de CGRP en sangre periférica durante la crisis de migraña. En estos estudios los niveles de CGRP, obtenidos en vena cubital, se han mostrado consistentemente elevados comparado con controles<sup>161,162</sup>. Adicionalmente, dos estudios realizados en sangre periférica y saliva en pacientes con ME en periodo intercrítico en el que no presentaban cefalea identificaron una elevación de los niveles de CGRP; por tanto, conceptualmente muy en línea con nuestro trabajo<sup>166,167</sup>.

Nuestros resultados muestran por primera vez un aumento de los niveles de CGRP en MC fuera de los ataques de migraña y en ausencia de medicación sintomática durante al menos 24 horas. No hay



datos previos de niveles sanguíneos de CGRP en pacientes con MC. El único referente lo podemos encontrar en el estudio de Ashina et al. en el que no se encontraron diferencias en los niveles plasmáticos interictales de CGRP entre pacientes con cefalea de tensión crónica y controles sanos. Sin embargo, un subanálisis posterior mostró que 8 pacientes con cefalea de características pulsátiles (y que con toda seguridad hubieran sido diagnosticados como MC de acuerdo con los criterios actuales), tenían niveles significativamente mayores de CGRP en sangre periférica en comparación con los controles<sup>169</sup>. Adicionalmente, y en línea con nuestros resultados, en un estudio previo realizado en pacientes con MC se encontraron niveles de CGRP elevados durante el periodo intercrítico pero la determinación se realizó en líquido cefalorraquídeo<sup>168</sup>.

Estudios publicados con posterioridad al nuestro muestran resultados variables. Concordando con nuestros hallazgos, un estudio realizado con un tamaño muestral elevado (62 pacientes), evidenció niveles elevados de CGRP en MC comparado con controles<sup>210</sup>. Por el contrario, dos estudios publicados estos últimos meses difieren con nuestros hallazgos y en ambos casos los niveles de CGRP en MC no difirieron con los de los controles<sup>211,212</sup>.

- El primero de estos estudios se llevó a cabo en Corea del Sur. En este estudio los resultados mostraron que los niveles de CGRP en MC no solo no aumentaban en comparación con controles sanos sin cefalea, sino que eran numéricamente más bajos. Llamativamente, porque contradicen todos los estudios previos, los niveles de CGRP ictales tampoco estaban elevados. Es cierto que en nuestro estudio, y este es un dato importante, aproximadamente un 30% de los pacientes con MC tenían niveles similares a los de los controles, pero incluso teniendo en cuenta este dato las diferencias son llamativas. Las explicaciones potenciales para las mismas son múltiples. En primer lugar, hay que tener en cuenta que la serie coreana solo incluyó 34 pacientes y no pareados correctamente por edad o sexo. A diferencia de los criterios de este trabajo o del trabajo del grupo de Leira<sup>210</sup> en los que para que una muestra fuera considerada interictal era obligatorio no haber tenido cefalea ni tomado analgésicos 24 horas antes, en el estudio coreano no tuvieron en cuenta este respeto temporal, algo que sin duda influyó en sus resultados “ictales”. Por otro lado, no podemos olvidar los problemas que reproducibilidad innatos aún a los ELISA que actualmente esta comercializados y que nosotros experimentamos en múltiples ocasiones,

dependiendo de los diversos suministradores. Por último, las características clínicas de los pacientes no son del todo superponibles. En la serie coreana hay, por ejemplo, menos pacientes con historia de aura (y, como veremos, tener aura se asocia a niveles más elevados) y más pacientes con abuso de analgésicos o de fibromialgia. También el peso de los pacientes coreanos es inferior al de los pacientes españoles y es posible que la obesidad se asocie a un aumento en los niveles de CGRP. En síntesis, hay diferencias sensibles entre ambos trabajos metodológicas y etnográficas, que tendrán que ser testadas en el futuro.

- En cuanto al segundo estudio, llevado a cabo en la clínica de cefaleas de Copenhague en pacientes con cefalea crónica con abuso de analgésicos, los resultados son más que cuestionables. Por un lado, utilizaron los criterios de la revisión de la segunda versión de la clasificación internacional de las cefaleas de la IHS, lo que llevó a incluir una mezcla de pacientes: aproximadamente dos tercios cumplirían criterios de MC (con abuso de analgésicos) y un 30% de cefalea de tensión crónica, entidad en la que los niveles de CGRP sabemos que son normales<sup>213</sup>. Por otro lado, el número de pacientes incluido es increíblemente bajo pues solo reclutaron 17 pacientes en un año en una gran clínica de cefaleas y a pesar de que afirman en su artículo que eran consecutivos. Siete de estos 17 pacientes no completaron el estudio. Por último, los autores indican que no tuvieron en cuenta ni que no hubiera cefalea, ni que hubieran tomado analgésicos 24 horas antes de la toma de la muestra, lo que -según han demostrado diversos estudios - invalida los resultados, ya que se ha demostrado que la toma, por ejemplo, de un triptán normaliza los niveles de CGRP<sup>159,160,161,214</sup>.

Los niveles de CGRP fueron significativamente mayores en las mujeres con MC y aura en comparación con aquellas pacientes con MC que nunca habían experimentado aura. Hallazgos similares fueron descritos en dos estudios en los que se determinaron niveles de CGRP en pacientes con migraña seleccionadas desde una consulta específica de cefaleas<sup>161,167</sup>. Sin embargo, esta diferencia de niveles de CGRP asociada al aura no se objetivó entre las pacientes con ME. Existen varias explicaciones potenciales para este aumento en el nivel de CGRP en mujeres con MC e historia de aura. En primer lugar, podría argumentarse que el aura facilita por sí misma la elevación de los niveles de CGRP en la sangre de los pacientes migrañosos. Es posible que la propia fisiopatología del aura, y en concreto el fenómeno de DPC, sea capaz de activar las terminales

nerviosas sensitivas alrededor de los vasos sanguíneos piales y aumentar la expresión del gen CALCI a nivel del córtex. También es posible, aunque es un tema sujeto a controversia, que el aura de lugar a ataques de migraña más dolorosos y por ende con mayor liberación de CGRP. Sin embargo, en desacuerdo con estos argumentos, aunque la proporción de pacientes con aura en nuestra serie de MC fue elevada (44,7%), sólo 4 pacientes presentaron aura de manera frecuente (1 al mes). Finalmente, y pensamos que ésta es la explicación más plausible, puede argumentarse que estas diferencias asociadas a la presencia de aura, derivan de una mayor fiabilidad del diagnóstico de MC en contraposición con otras cefaleas crónicas, al ser el aura un marcador clínico específico de migraña. Dicho de otra manera, si existe aura el diagnóstico de la migraña podríamos decir que es seguro; si no existe aura tal vez sea posible que la cefalea (aún cumpliendo criterios de MC) sea en realidad una cefalea puramente tensional. Estos resultados traducen un papel protagonista de la frecuencia de ataques en la elevación de los niveles de CGRP con un papel secundario del aura, ya que como se ha explicado anteriormente la correcta identificación de los pacientes con MC en base a la presencia de este síntoma conlleva una correcta inclusión de pacientes con alta frecuencia de ataques de migraña.

En este estudio, los niveles de CGRP en MC no se modificaron en relación con la edad, la presencia de factores de riesgo cardiovascular, ni otras comorbilidades analizadas como depresión, o fibromialgia. Los niveles tampoco se vieron influenciados por los diferentes tratamientos preventivos y sintomáticos. La mayoría de nuestros pacientes con MC en nuestro trabajo se encontraban en tratamiento preventivo. No lo retiramos por razones éticas. A pesar de ello creemos que más que una limitación podría indicar que nuestros resultados tiene mayor relevancia ya que estos fármacos pueden disminuir la activación del STV y en consecuencia los niveles de CGRP. De especial interés resulta la ausencia de diferencias en los niveles de CGRP entre el grupo de mujeres de MC con y sin abuso de analgésicos y vendrían a confirmar que en la mayor parte de los pacientes con MC que consumen frecuentemente analgésicos ésta no es la causa de su cronificación. Dicho de otra manera, la toma frecuente de analgésicos sería la consecuencia y no la causa de experimentar cefaleas frecuentes. Estos hallazgos sugieren una misma base fisiopatológica subyacente a la MC y a la cefalea crónica por abuso de analgésicos y de nuevo van en contra de los hallazgos arriba comentados del grupo danés<sup>212</sup>.

En este trabajo la elevación interictal de los niveles de CGRP por encima de 58,22 pg/mL ha demostrado ser un marcador con una alta especificidad para el diagnóstico de MC. Por lo tanto estos niveles permitirían diferenciar la MC frente a otras entidades de la ME o la CR. Como ejemplo, en el grupo de ME, 14 de las 43 mujeres incluidas habían evolucionado desde una situación de MC gracias a diferentes tratamientos preventivos. En este subconjunto de pacientes los niveles de CGRP fueron de 39,7 pg/mL, es decir, en el límite de la ME y alejados de los niveles para MC. Estudios previos han objetivado la elevación de los niveles de CGRP durante los ataques en pacientes con CR<sup>215</sup>; sin embargo, no hay datos publicados que demuestren un papel del CGRP como biomarcador en CR en periodos sin dolor por lo que se decidió incluir a estos pacientes como un grupo control. En el grupo de pacientes con CR los niveles interictales de CGRP resultaron similares a los objetivados en ME, muy por debajo las cifras de la MC. Por otro lado, estudios previos realizados en otras cefaleas primarias no han demostrado una elevación de CGRP, como es el caso de la cefalea cervicogénica o la cefalea tensional crónica<sup>213,216</sup>.

Para reforzar la especificidad de nuestros resultados, sería de utilidad la comparación en un futuro de los niveles de CGRP en otros tipos de cefalea primaria (como la hemicránea continua o la cefalea persistente de reciente inicio) o incluso en cefaleas secundarias en las que el CGRP podría jugar un papel teórico en su fisiopatología, tales como la cefalea secundaria a la hemorragia subaracnoidea, en la que pueden funcionar los triptanes<sup>217</sup>, o de la arteritis de la temporal, que también cursa con inflamación vascular pericraneal.

## **2. CGRP COMO PREDICTOR DE RESPUESTA A TRATAMIENTO CON ONABOTA.**

Si los niveles sanguíneos intercíticos de CGRP son un biomarcador fiable de MC deberían, además de ayudar a un diagnóstico más objetivo de la MC, ser útiles para monitorizar la evolución clínica y para determinar la respuesta a diferentes tratamientos de una manera más objetiva. En la práctica clínica habitual en el tratamiento de la MC se utilizan fármacos preventivos con eficacia en la ME a pesar de que en MC sólo hay evidencia para topiramato<sup>218</sup> y en menor grado para el ácido valproico<sup>219</sup>. No fue hasta fechas recientes cuando se demostró la eficacia de las inyecciones pericraneales de 155-195 U de onabotA en dos grandes ensayos controlados de fase III<sup>208,209</sup>. Esta eficacia también se corroboró en varios estudios abiertos y en este trabajo, en la que tres cuartas partes de nuestros pacientes mostraron una respuesta clínica favorable al tratamiento preventivo con onabotA.

El mecanismo exacto de acción de las inyecciones pericraneales de onabotA que conducen a la prevención de la migraña aún no está claro, y aún no se han identificado predictores de respuesta fiables, salvo tal vez la corta evolución de la MC y que el dolor conserve características migrañosas<sup>220</sup>. En el análisis combinado de los 2 ensayos de fase III con onabotA en MC no se encontró correlación entre 85 posibles predictores clínicos y la respuesta a onabotA<sup>221</sup>. Nuestros resultados muestran que niveles intercíticos elevados de CGRP en sangre periférica en MC previos al inicio de tratamiento con onabotA están relacionados con la respuesta al tratamiento. Los niveles de CGRP fueron significativamente más altos en los pacientes con MC que respondieron a onabotA en comparación con los no respondedores. Además, los niveles de CGRP mostraron una alta especificidad puesto que valores por encima de 72 pg/mL permiten una predicción correcta de la respuesta a onabotA en el 95% de los casos y multiplican la probabilidad de respuesta por 28. Los niveles de CGRP disminuyeron de manera homogénea en prácticamente todos los pacientes respondedores. Debido a un número relativamente bajo de pacientes, no hubo diferencias significativas entre los que mostraron una excelente respuesta en comparación con aquellos con una respuesta moderada. Sin embargo, los niveles de CGRP fueron numéricamente más altos en el grupo con una respuesta excelente, sugiriendo de nuevo una relación entre los niveles de este

neuropéptido y la tasa de respuesta a onabotA. Por lo tanto, los niveles de CGRP intercíticos en sangre periférica en MC pueden ser un buen predictor de respuesta a tratamiento con onabotA, lo que confirmaría la utilidad de este biomarcador en la MC.

Tan sólo dos estudios posteriores a nuestro trabajo comparan los niveles de CGRP y la respuesta al tratamiento con onabotA. El primero de ellos, metodológicamente similar a este trabajo, concuerda con nuestros datos mostrando niveles de CGRP elevados en pacientes con buena respuesta a onabotA comparado con los pacientes que no respondieron al tratamiento<sup>210</sup>. De hecho, en el trabajo de Domínguez et al. las diferencias en los niveles de CGRP entre los pacientes con MC respondedores y no respondedores a onabotA fueron superiores a las encontradas en nuestro estudio. En contraposición, el estudio realizado en Corea del Sur no mostró relación alguna entre los niveles de CGRP y la respuesta al tratamiento. Sin embargo, cabe destacar que este trabajo constaba tan sólo de 11 pacientes con MC en tratamiento con onabotA y como se ha mencionado con anterioridad este estudio presentaba carencias metodológicas que obligan a tomar los resultados con cautela<sup>211</sup>.

Sin embargo y a pesar de la alta especificidad, 31 pacientes con niveles de CGRP bajos respondieron a tratamiento con onabotA (8 de ellos con excelente respuesta) y 1 paciente con niveles elevados de CGRP no respondió al tratamiento. A pesar de que estas cifras son las esperables en la respuesta al placebo en los estudios de cefaleas, esto podría también sugerir la posible participación de otras moléculas en la fisiopatología de la MC, por ejemplo, aquellas procedentes del brazo parasimpático del STV como VIP o PACAP.

### **3. CORRELACIÓN ENTRE LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE CGRP Y RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO CON ONABOTÁ.**

Como se refiere con anterioridad, además de ser un predictor de respuesta, un buen biomarcador debería modificarse de manera paralela a la respuesta clínica tras la administración de un tratamiento específico. No existen trabajos previos que hayan analizado la evolución de los niveles de CGRP antes y después del tratamiento con onabotA. Los resultados de este estudio muestran que los niveles de CGRP en sangre periférica en periodo interictal en pacientes con MC disminuyen tras el tratamiento con onabotA. Esos hallazgos no solo apoyan el valor del CGRP como biomarcador de la MC, sino que ayudan a clarificar el mecanismo de acción de onabotA en MC.

Nuestros resultados no sólo muestran que los niveles de CGRP se reducen después del tratamiento onabotA, sino también que esta reducción se correlaciona con su tasa de eficacia. De hecho, los niveles de CGRP disminuyeron homogéneamente en casi todos los individuos que respondieron al tratamiento. Con la excepción de un paciente, en aquellos que no respondieron los niveles previos al tratamiento de CGRP se encontraron por debajo del umbral de MC y no se redujeron tras las inyecciones de onabotA. Esto refuerza el papel de los niveles de CGRP como predictores de la respuesta a este tratamiento.

Estos hallazgos en los no respondedores podrían ser explicados por múltiples causas como la ausencia de un grupo control, el hecho de que la mayoría de estos pacientes permanecieran en tratamiento preventivo oral, el número relativamente bajo de no respondedores en nuestra serie y la subjetividad en la percepción del dolor entre otros. Sin embargo, estos resultados también podrían ser la consecuencia de la dificultad en la clasificación de pacientes con cefalea crónica. Dicho de otro modo, nuestros hallazgos podrían indicar que algunos pacientes con un fenotipo de MC en realidad presentan otro tipo de cefalea (como por ejemplo cefalea psicógena o cefalea tensional) en cuya fisiopatología el CGRP no parece estar implicado.

En el año 2010 se aprobó el uso de onabotA para el tratamiento preventivo de MC basado en los resultados del estudio PREEMPT que se refrendaron posteriormente en varios estudios abiertos<sup>208,209</sup>. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción mediante el cual las inyecciones pericraniales de onabotA ejercen el efecto preventivo en la MC.

Una de las primeras teorías propuestas en relación al mecanismo terapéutico promulgaba que tras las inyecciones de onabotA se produciría la internalización de la neurotoxina en las terminales presinápticas de la unión neuromuscular y la disrupción del complejo SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)<sup>200</sup>. Este complejo interviene en la fusión de las vesículas presinápticas a la membrana para la liberación de neurotransmisores por lo que su alteración dificultaría la contracción muscular. La inhibición muscular podría ser el mecanismo subyacente que explica en parte el efecto analgésico de onabotA en otras afecciones dolorosas crónicas. Sin embargo, es poco plausible que esta sea un elemento clave en la cronificación del dolor en las cefaleas, ya que onabotA no es eficaz en el tratamiento de la cefalea tensional crónica, entidad en la que la contractura muscular tiene un papel principal en su fisiopatología. Teorías posteriores avalan el papel de CGRP como mediador en la respuesta al tratamiento con onabotA. Estudios en animales han proporcionado evidencia de un efecto antinociceptivo de onabotA mediante la inhibición de la liberación de moléculas con acción nociceptiva, entre otras CGRP<sup>203</sup>.

El CGRP se ha implicado en la fisiopatología de la migraña a través de múltiples mecanismos. Cuando se produce la activación del STV es liberado tanto a nivel periférico, en las proyecciones aferentes periféricas y en el GT, como a nivel central en las proyecciones aferentes centrales y en diferentes estructuras relacionadas con la vía nociceptiva. A nivel de las terminales periféricas se ha descrito su implicación como vasodilatador y promotor de la inflamación neurógena, resultando en última instancia en la sensibilización periférica. En el GT, promueve la expresión de genes que refuerzan la vía nociceptiva. A nivel de las proyecciones aferentes centrales, actúa como un neuromodulador facilitando las sinapsis en el CTC y así favoreciendo la sensibilización central. Finalmente, se ha descrito su participación en la fisiopatología de síntomas clásicos asociados a la migraña, como la fotofobia, y en otros mecanismos desencadenantes de la activación del SVT como



la DPC. Teniendo en cuenta estas acciones y tomando en conjunto el resultado de estos trabajos experimentales y de nuestro estudio, se puede argumentar que el mecanismo primario de acción de onabotA es la reversión de la sensibilización periférica y central como resultado de la inhibición de la liberación de CGRP u otras moléculas productoras de dolor. Esta hipótesis también explicaría la ausencia de eficacia de onabotA en la ME, una condición en la que no se ha producido la sensibilización de las neuronas centrales.

#### **4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.**

Este estudio presenta diversas limitaciones:

- Nuestros resultados provienen de una población seleccionada de pacientes con cefalea, con un número limitado de pacientes con MC y controles, aunque constituye, con diferencia, la serie más larga en MC. En todo caso, nuestros hallazgos solo son aplicables a mujeres y reclutadas en una consulta especializada en cefaleas.
- En segundo lugar, para mostrar la consistencia de nuestros datos de respuesta a onabotA, sería necesario un mayor número de determinaciones antes y después del tratamiento.
- La subjetividad de las escalas de percepción del dolor y del calendario de cefaleas para valorar la respuesta al tratamiento hace que estos resultados siempre tengan un componente subjetivo.
- Para demostrar la verdadera especificidad, además de en controles y pacientes de CR los niveles de CGRP deberían ser testados en otras entidades como la cefalea diaria persistente de reciente comienzo, hemicránea continua y en cefaleas secundarias que puedan imitar un fenotipo de MC.
- El hecho de que la mayoría los pacientes con migraña recibía tratamiento preventivo diario por razones éticas podría considerarse como una limitación de este estudio. Sin embargo esto podría hacer que nuestros resultados sean aún más relevantes, dada la potencial capacidad de estos fármacos para reducir la activación del STV y disminuir la liberación de CGRP.
- Desconocemos realmente la influencia de muchos aspectos metodológicos en los niveles de CGRP. Por un lado, nos hemos encontrado a lo largo del estudio que los diferentes kits de ELISA, dependiendo del proveedor, ofrecen resultados en ocasiones dispares, algo que dificulta la comparación de datos entre los diferentes centros y que tendrá que ser unificado en el futuro. Por otro lado, desconocemos la influencia que tiene en los resultados la manipulación y centrifugación más o menos inmediata de las muestras o el tiempo de congelación. Este hecho puede ser muy relevante si tenemos en cuenta que la vida media del CGRP es de alrededor de 20

minutos. Además, no sabemos la influencia que factores como la hora del día o el momento del ciclo menstrual, por poner un par de ejemplo, puedan tener en la determinación de este péptido. Por último, desconocemos en realidad si los valores de CGRP que estamos midiendo elevados provienen del STV o de otros lugares del organismo, al ser el CGRP un péptido extraordinariamente diseminado en la economía<sup>149</sup>.

- Finalmente, aunque en global los niveles de CGRP estaban elevados en la MC, hemos de reconocer que aproximadamente un 30% de los pacientes con MC presentaban niveles de CGRP en los límites de los controles. Esto indica, por un lado, que, al menos en algunos pacientes, han de existir otras moléculas implicadas en la fisiopatología de la MC, como podrían ser el glutamato o determinados péptidos parasimpáticos (VIP o PACAP) y, por otro, que el CGRP no será en principio un marcador sine qua non para el diagnóstico de esta entidad.

## **VI. CONCLUSIONES**



1- En pacientes con migraña crónica, los niveles interictales de CGRP en sangre periférica se encuentran elevados. Esta elevación es superior a la encontrada en pacientes con migraña episódica y respecto a controles sanos sin cefalea.

2- Niveles interictales de CGRP en sangre periférica superiores a 43,4 pg/mL permiten clasificar correctamente a los pacientes con migraña crónica respecto a los controles sanos sin cefalea.

3- Niveles interictales de CGRP en sangre periférica por encima de 58,2 pg/mL permiten clasificar correctamente a los pacientes de migraña crónica respecto a los de migraña episódica.

4- En pacientes con migraña crónica existe una correlación directa entre los niveles interictales de CGRP en sangre periférica y la respuesta al tratamiento con onabotA.

5- En pacientes con migraña crónica, niveles interictales de CGRP en sangre periférica superiores a 72 pg/mL son predictores de una buena respuesta clínica al tratamiento con onabotA.

6- Existe una correlación directa entre la respuesta clínica al tratamiento con onabotA en pacientes con migraña crónica y el descenso de los niveles de CGRP en sangre periférica.

7- En base a conclusiones previas, puede afirmarse que la determinación de niveles interictales de CGRP en sangre periférica es un potencial biomarcador de migraña crónica, si bien el hecho de que aproximadamente un 30% de los pacientes con un fenotipo MC presenten resultados similares a los de los controles indicaría que existen otras moléculas implicadas en su fisiopatología.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





1. Headache Classification Committee of the International Headache. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018; 38:1-211.
2. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 *Lancet*. 2017; 390:1211-59.
3. Lipton RB, Bigal ME, Diamond M, Freitag F, Reed ML, Stewart WF on behalf the AMPP Advisory Group. Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. *Neurology*. 2007; 68:343-9.
4. Pozo-Rosich P. Migraña crónica: epidemiología e impacto. *Rev Neurol*. 2012; 54:S3-11.
5. Carod-Artal FJ, Irimia P, Ezpeleta D. Migraña crónica: definición, epidemiología, factores de riesgo y tratamiento. *Rev Neurol*. 2012; 54:629-37.
6. Graham JR, Wolff HG. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch Neurol Psychiatry*. 1938; 39:737–63.
7. Ray BS, Wolff HG. Experimental studies on headache. Pain sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg*. 1940; 41:813–56.
8. Ahn AH. On the temporal relationship between throbbing migraine pain and arterial pulse. *Headache*. 2010; 50:1507–10.
9. Mirza AF, Mo J, Holt JL, Kairalla JA, Heft MW, Ding M et al. Is there a relationship between throbbing pain and arterial pulsations? *J Neurosci*. 2012; 32:7572–6.
10. Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, Fahrenkrug J, Olesen J, Ashina M. Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilatation but does not induce migraine. *Cephalalgia*. 2007; 28:226–36.
11. Levy D, Burstein R, Strassman AM. Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine. *Ann. Neurol*. 2005; 58:698–705.
12. Levy D, Strassman AM. Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *J. Neurophysiol*. 2004; 92:766–72.
13. Zhang X, Kainz V, Zhao J, Strassman AM, Levy D. Vascular extracellular signal-regulated kinase mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. *Ann Neurol*. 2013; 73:741–50.

14. Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Iversen HK, Lassen NA, Andersen AR et al. Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks. *Ann Neurol*. 1990; 28:791–98.
15. Olesen, J. Cerebral and extracranial circulatory disturbances in migraine: pathophysiological implications. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1991; 3:1–28.
16. Sanchez del Rio, M, Bakker D, Wu O, Agosti R, Mitsikostas DD, Ostergaard L et al. Perfusion weighted imaging during migraine: spontaneous visual aura and headache. *Cephalalgia*. 1999; 19:701–7.
17. Schoonman GG, van der Grond J, Kortmann C, van der Geest RJ, Terwindt GM, M.D.Ferrari. Migraine headache is not associated with cerebral or meningeal vasodilatation - a 3T magnetic resonance angiography study. *Brain*. 2008; 131:2192-200.
18. Asghar MS, Hansen AE, Amin FM, van der Geest RJ, Koning Pv, Larsson HB el al. Evidence for a vascular factor in migraine. *Ann Neurol*. 2011; 69:635-45.
19. Khan S, Amin FM, Christensen CE, Ghanizada H, Younis S, Olinger ACR et al. Meningeal contribution to migraine pain: a magnetic resonance angiography study. *Brain*. 2019; 142:93-102.
20. Amin FM, Asghar MS, Hougaard A, Hansen AE, Larsen VA, de Koning PJ et al. Magnetic resonance angiography of intracranial and extracranial arteries in patients with spontaneous migraine without aura: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2013; 12:454-61.
21. Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol*. 1984; 16: 157–68.
22. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci*. 1987; 7:4129–36.
23. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature*. 1996; 384:560–4.
24. Zhang XC, Strassman AM, Burstein R, Levy D. Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. *Pharmacol Exp Ther*. 2007; 322:806-12.
25. Klapper J. The pharmacologic treatment of acute migraine headaches. *J Pain Symptom Manage*. 1993; 8:140-7.
26. Woldeamanuel YW, Rapoport AM, Cowan RP. The place of corticosteroids in migraine attack management: A 65-year systematic review with pooled analysis and critical appraisal. *Cephalalgia*. 2015; 35:996-1024.

27. Sicuteri F, Ricci M, Monfardini R, Ficini M. Experimental headache with endogenous histamine; first results obtained by 48/80, a histamine-liberator drug, in the cephalic and peripheral circulatory systems of man. *Acta Allergol.* 1957;11:188-92.
28. Monro J, Carini C, Brostoff J. Migraine is a food-allergic disease. *Lancet.* 1984; 2:719-21.
29. Levy D, Kainz V, Burstein R, Strassman AM. Mast cell degranulation distinctly activates trigemino-cervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity. *Brain Behav Immun.* 2012; 26:311-7.
30. Perini F, D'Andrea G, Galloni E, Pignatelli F, Billo G, Alba S et al. Plasma cytokine levels in migraineurs and controls. *Headache.* 2005; 45:926-31.
31. Sarchielli P, Alberti A, Baldi A, Coppola F, Rossi C, Pierguidi L et al. Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally. *Headache.* 2006; 46:200-7.
32. Rozen T, Swidan SZ. Elevation of CSF tumor necrosis factor alpha levels in new daily persistent headache and treatment refractory chronic migraine. *Headache.* 2007; 47:1050-5.
33. Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology.* 2008; 123:398-410.
34. May A, Goadsby PJ. Substance P receptor antagonists in the therapy of migraine. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001; 10:673-8.
35. Goldstein DJ, Offen WW, Klein EG, Phebus LA, Hipskind P, Johnson KW et al. Lanepitant, an NK-1 antagonist, in migraine prevention. *Cephalalgia.* 2001; 21:102-6.
36. Roon KI, Olesen J, Diener HC, Ellis P, Hettiarachchi J, Poole PH et al. No acute antimigraine efficacy of CP-122,288, a highly potent inhibitor of neurogenic inflammation: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Ann Neurol.* 2000; 47:238-41.
37. Roshni Ramachandra. Neurogenic inflammation and its role in migraine. *Semi Immunopathol.* 2018; 40:301-14.
38. Palm-Meinders IH, Koppen H, Terwindt GM, Launer LJ, Konishi J, Moonen JME et al. Structural brain changes in migraine. *JAMA.* 2012, 308:1889 –97.
39. Cady R, Schreiber C, Farmer K, Sheftell F. Primary headaches: a convergence hypothesis. *Headache.* 2002; 42:204-16.
40. Goadsby PJ. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2007; 13:39-44.

41. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM et al. , Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell*. 1996;87:543-52.
42. De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet*. 2003; 33:192-6.
43. Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S et al. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet*. 2005; 366:371-7.
44. Weiller C, May A, Limmroth V, Jüptner M, Kaube H, Schayck RV et al. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med*. 1995; 1:658-60.
45. Maniyar FH, Sprenger T, Monteith T, Schankin C, Goadsby PJ. Brain activations in the premonitory phase of nitroglycerin-triggered migraine attacks. *Brain*. 2014;137:232-41.
46. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*. 2001; 81:1065-96.
47. Pietrobon D, Moskowitz MA. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci*. 2014; 15:379-93.
48. Leao JJ. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Neurophysiol*. 1947; 10:409-14.
49. Lauritzen M, Jørgensen MB, Diemer NH, Gjedde A, Hansen AJ. Persistent oligemia of rat cerebral cortex in the wake of spreading depression. *Ann Neurol*. 1982;12:469-74.
50. Olesen J, Larsen B, Lauritzen M. Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann Neurol*. 1981; 9:344-52.
51. Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med*. 1994; 331:1689-92.
52. Cutrer FM, Sorensen AG, Weisskoff RM, Ostergaard L, Sanchez del Rio M, Lee EJ et al. Perfusion-weighted imaging defects during spontaneous migrainous aura. *Ann Neurol*. 1998; 43:25-31.
53. Sánchez del Rio M, Bakker D, Wu O, Agosti R, Mitsikostas DD, Ostergaard L et al. Perfusion weighted imaging during migraine: spontaneous visual aura and headache. *Cephalalgia*. 1999; 19:701-7.

54. Eikermann-Haerter K, Dileköz E, Kudo C, Savitz SI, Waeber C, Baum MJ et al. Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *J Clin Invest*. 2009; 119:99-109.
55. Leo L, Gherardini L, Barone V, De Fusco M, Pietrobon D, Pizzorusso T et al. Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet*. 2011; 7:e1002129.
56. Zhang X, Levy D, Noseda R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci*. 2010; 30:8807-14.
57. Zhang X, Levy D, Kainz V, Noseda R, Jakubowski M, Burstein R. Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol*. 2011; 69:855-65.
58. Zhao J, Levy D. Modulation of intracranial meningeal nociceptor activity by cortical spreading depression: a reassessment. *J Neurophysiol*. 2015;113:2778-85.
59. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*. 2002; 8:136-42.
60. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Koçak E, Sen ZD et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*. 2013; 339:1092-5.
61. Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP. Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci*. 1993; 13:1167-77.
62. Marshall WH, Essig CF. Relation of air exposure of cortex to spreading depression of Leão. *J Neurophysiol*. 1951;14:265-73.
63. James MF, Smith MI, Bockhorst KH, Hall LD, Houston GC, Papadakis NG et al. Cortical spreading depression in the gyrencephalic feline brain studied by magnetic resonance imaging. *J Physiol*. 1999; 519:415-25.
64. Pearce JM. Is migraine explained by Leao's spreading depression? *Lancet*. 1985; 2:763-6.
65. Drenckhahn C, Winkler MK, Major S, Scheel M, Kang EJ, Pinczolics A et al. Correlates of spreading depolarization in human scalp electroencephalography. *Brain*. 2012; 135:853-68.
66. Hartings JA, Wilson JA, Hinzman JM, Pollandt S, Dreier JP, DiNapoli V et al. Spreading depression in continuous electroencephalography of brain trauma. *Ann Neurol*. 2014;76:681-94.

67. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ et al. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*. 2006;129:778-90.
68. Borgdorff P. Arguments against the role of cortical spreading depression in migraine. *Neurol Res*. 2018; 40:173-181.
69. McLachlan RS, Girvin JP. Spreading depression of Leão in rodent and human cortex. *Brain Res*. 1994; 666:133-6.
70. Ashina M, Hansen JM, Do TP, Melo-Carrillo A, Burstein R, Moskowitz MA. Migraine and the trigeminovascular system-40 years and counting. *Lancet Neurol*. 2019; 18:795-804.
71. Mayberg MR, Zervas NT, Moskowitz MA. Trigeminal projections to supratentorial pial and dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol*. 1984; 223:46–56.
72. Steiger HJ, Meakin CJ. The meningeal representation in the trigeminal ganglion—an experimental study in the cat. *Headache*. 1984; 24:305–9.
73. Liu Y, Broman J, Edvinsson L. Central projections of sensory innervation of the rat superior sagittal sinus. *Neuroscience*. 2004; 129:431–7.
74. Lee SH, Shin KJ, Koh KS, Song WC. Visualization of the tentorial innervation of human dura mater. *J Anat*. 2017; 231:683-9.
75. Schueler M, Neuhuber WL, De Col R, Messlinger K. Innervation of rat and human dura mater and pericranial tissues in the parieto-temporal region by meningeal afferents. *Headache*. 2014; 54:996–1009.
76. Andres KH, von Düring M, Muszynski K, Schmidt RF. Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 1987;175:289-301.
77. O'Connor TP, van der Kooy D. Pattern of intracranial and extracranial projections of trigeminal ganglion cells. *J Neurosci*. 1986; 6:2200-7.
78. Edvinsson L, Uddman R. Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibres in dura mater--involvement in headache? *Cephalalgia*. 1981;1:175-9.
79. Keller JT, Marfurt CF, Dimlich RV, Tierney BE. Sympathetic innervation of the supratentorial dura mater of the rat. *J Comp Neurol*. 1989; 290:310–21.
80. Amenta F, Sancesario G, Ferrante F, Cavallotti C. Acetylcholinesterase-containing nerve fibers in the dura mater of guinea pig, mouse, and rat. *J Neural Transm*. 1980;47:237-42.

81. Edvinsson L, Hara H, Uddman R. Retrograde tracing of nerve fibers to the rat middle cerebral artery with true blue: colocalization with different peptides. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989; 9:212-8.
82. Jansen I, Uddman R, Ekman R, Olesen J, Ottosson A, Edvinsson L. Distribution and effects of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, substance P, and calcitonin gene-related peptide in human middle meningeal arteries: comparison with cerebral and temporal arteries. *Peptides.* 1992; 13:527-36.
83. Faraci FM, Kadel KA, Heistad DD. Vascular responses of dura mater. *Am J Physiol.* 1989; 257:H157-61.
84. Suzuki N, Hardebo JE, Owman C. Origins and pathways of cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide-positive nerves in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988; 8:697-712.
85. Messlinger K, Hanesch U, Baumgärtel M, Trost B, Schmidt RF. Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivity. *Anat Embryol (Berl).* 1993; 188:219-37.
86. Edvinsson L, Elsås T, Suzuki N, Shimizu T, Lee TJ. Origin and Co-localization of nitric oxide synthase, CGRP, PACAP, and VIP in the cerebral circulation of the rat. *Microsc Res Tech.* 2001; 53:221-8.
87. Dimlich RV, Keller JT, Strauss TA, Fritts MJ. Linear arrays of homogeneous mast cells in the dura mater of the rat. *J Neurocytol.* 1991; 20:485-503.
88. Dimitriadou V, Rouleau A, Trung Tuong MD, Newlands GJ, Miller HR, Luffau G et al. Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. *Neuroscience.* 1997; 77:829-39.
89. Kosaras B, Jakubowski M, Kainz V, Burstein R. Sensory innervation of the calvarial bones of the mouse. *J Comp Neurol.* 2009; 515:331-48.
90. Schueler M, Neuhuber WL, De Col R, Messlinger K. Innervation of rat and human dura mater and pericranial tissues in the parieto-temporal region by meningeal afferents. *Headache.* 2014; 54: 996–1009.
91. Schueler M, Messlinger K, Dux M, Neuhuber WL, De Col R. Extracranial projections of meningeal afferents and their impact on meningeal nociception and headache. *Pain* 2013; 154:1622–31.
92. LaGuardia JJ, Cohrs RJ and Gilden DH. Numbers of neurons and non-neuronal cells in human trigeminal ganglia. *Neurol Res.* 2000; 22: 565–6.



93. Glenn JA, Sonceau JB, Wynder HJ, Thomas WE. Histochemical evidence for microglia-like macrophages in the rat trigeminal ganglion. *J Anat.* 1993; 183:475-81.
94. Alvarez FJ, Morris HR, Priestley JV. Sub-populations of smaller diameter trigeminal primary afferent neurons defined by expression of calcitonin gene-related peptide and the cell surface oligosaccharide recognized by monoclonal antibody LA4. *J Neurocytol.* 1991; 20:716-31.
95. Lee Y, Kawai Y, Shiosaka S, Takami K, Kiyama H, Hillyard CJ et al. Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Res.* 1985; 330:194-6.
96. Eftekhari S, Salvatore CA, Calamari A, Kane SA, Tajti J, Edvinsson L. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience.* 2010; 169:683-96.
97. Franceschini A, Nair A, Bale T, van den Maagdenberg AM, Nistri A, Fabbretti E. Functional crosstalk in culture between macrophages and trigeminal sensory neurons of a mouse genetic model of migraine. *BMC Neurosci.* 2012; 13:143.
98. Olszewski J. On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 1950. 92:401–13.
99. Goadsby PJ, Akerman S, Storer RJ. Evidence for postjunctional serotonin (5-HT<sub>1</sub>) receptors in the trigeminocervical complex. *Ann Neurol.* 2001; 50:804-7.
100. Hoskin KL, Zagami AS, Goadsby PJ. Stimulation of the middle meningeal artery leads to Fos expression in the trigeminocervical nucleus: a comparative study of monkey and cat. *J Anat.* 1999; 194:579-88.
101. Messlinger K, Russo AF. Current understanding of trigeminal ganglion structure and function in headache. *Cephalalgia.* 2018. [Epub ahead of print]
102. O'Connor TP, Van der Kooy D. Cell death organizes the postnatal development of the trigeminal innervation of the cerebral vasculature. *Brain Research.* 1986; 392: 223–33.
103. Lennerz JK, Rühle V, Ceppa EP, Neuhuber WL, Bunnett NW, Grady EF et al. Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *Journal of Comparative Neurology.* 2008; 507:1277–99.

104. Tashiro T, Takahashi O, Satoda T, Matsushima R, Uemura-Sumi M, Mizuno N. Distribution of axons showing calcitonin gene-related peptide- and/or substance P-like immunoreactivity in the sensory trigeminal nuclei of the cat. *Neurosci Res.* 1991; 11:119-33.
105. Salt TE, Morris R, Hill RG. Distribution of substance P-responsive and nociceptive neurones in relation to substance P-immunoreactivity within the caudal trigeminal nucleus of the rat. *Brain Res.* 1983; 273:217-28.
106. Henry, M.A., Johnson, L.R., Nousek-Goebel, N., Westrum, L.E. (1996). Light microscopic localization of calcitonin gene-related peptide in the normal feline trigeminal system and following retrogasserian rhizotomy. *Journal of Comparative Neurology* 365: 526–540.
107. Jenkins DW, Langmead CJ, Parsons AA, Strijbos PJ. Regulation of calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal nucleus caudalis slices in vitro. *Neurosci Lett.* 2004; 366:241-4.
108. Kageneck C, Nixdorf-Bergweiler BE, Messlinger K, Fischer MJ. Release of CGRP from mouse brainstem slices indicates central inhibitory effect of triptans and kynurenate. *J Headache Pain.* 2014;15:7.
109. Storer RJ, Goadsby PJ Microiontophoretic application of serotonin (5HT)1B/1D agonists inhibits trigeminal cell firing in the cat. *Brain.* 1997; 120:2171-7.
110. Nosedá R, Villanueva L. Functional architecture of central pain pathways: focus on the trigeminovascular system. En: Dalkara T, Moskowitz MA, editors. *Neurobiological basis of migraine.* Wiley-Blackwell; 2017. p. 69-90.
111. Gauriau C, Bernard JF. Posterior triangular thalamic neurons convey nociceptive messages to the secondary somatosensory and insular cortices in the rat. *J Neurosci.* 2004; 24:752-61.
112. Nosedá R, Monconduit L, Constandil L, Chalus M, Villanueva L. Central nervous system networks involved in the processing of meningeal and cutaneous inputs from the ophthalmic branch of the trigeminal nerve in the rat. *Cephalalgia.* 2008; 28:813-24.
113. Xiao Z, Martinez E, Kulkarny PM, Zhang Q, Hou Q, Rosenberg D et al. Cortical pain processing in the rat anterior cingulate cortex and primary somatosensory cortex. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13:165.
114. Contreras RJ, Gomez MM, Norgren R. Central origins of cranial nerve parasympathetic neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 1980; 190:373-94.
115. Spencer SE, Sawyer WB, Wada H, Platt KB, Loewy AD. CNS projections to the pterygopalatine parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study. *Brain Res.* 1990; 534:149-69.

116. Yarnitsky. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2010; 23:611-5
117. Bernard JF, Dallel R, Raboisson P, Villanueva L, Le Bars D. Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol.* 1995; 353:480-505.
118. Malick A, Strassman RM, Burstein R. Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *J Neurophysiol.* 2000; 84:2078-112.
119. Lovick TA. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. *Prog Neurobiol.* 1993; 40:631-44.
120. Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ Jr. Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *J Neurosci.* 1987; 7:4159-64.
121. Cliffer KD, Burstein R, Giesler GJ Jr. Distributions of spinothalamic, spinothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *J Neurosci.* 1991; 11:852-68.
122. Newman HM, Stevens RT, Apkarian AV. Direct spinal projections to limbic and striatal areas: anterograde transport studies from the upper cervical spinal cord and the cervical enlargement in squirrel monkey and rat. *J Comp Neurol.* 1996; 365:640-58.
123. May A, Burstein R. Hypothalamic regulation of headache and migraine. *Cephalalgia.* 2019. [Epub ahead of print]
124. Villanueva L, Desbois C, Le Bars D, Bernard JF. Organization of diencephalic projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a retrograde and anterograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol.* 1998; 390:133-60.
125. Villanueva L, Bouhassira D, Le Bars D. The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain.* 1996; 67:231-40.
126. Monconduit L, Bourgeois L, Bernard JF, Le Bars D, Villanueva L. Ventromedial thalamic neurons convey nociceptive signals from the whole body surface to the dorsolateral neocortex. *J Neurosci.* 1999; 19:9063-72.
127. Derbyshire SW, Jones AK, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain.* 1997; 73:431-45.

128. Oliveras JL, Besson JM. Stimulation-produced analgesia in animals: behavioural investigations. *Prog Brain Res.* 1988; 77:141-57.
129. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol.* 1978; 4:451-62.
130. Holstege G, Kuypers HG. The anatomy of brain stem pathways to the spinal cord in cat. A labeled amino acid tracing study. *Prog Brain Res.* 1982; 57:145-75.
131. Raskin NH, Hosobuchi Y, Lamb S. Headache may arise from perturbation of brain. *Headache.* 1987; 27:416-20.
132. Knight YE, Goadsby PJ. The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine? *Neuroscience.* 2001;106:793-800.
133. Knight YE, Bartsch T, Kaube H, Goadsby PJ. P/Q-type calcium-channel blockade in the periaqueductal gray facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine? *J Neurosci.* 2002; 22:RC213.
134. Afridi SK, Giffin NJ, Kaube H, Friston KJ, Ward NS, Frackowiak RS et al. A positron emission tomographic study in spontaneous migraine. *Neurol.* 2005; 62:1270-5.
135. Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet.* 2001; 357:1016-7.
136. Villanueva L, Cadden SW, Le Bars D. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC): evidence for post-synaptic inhibition of trigeminal nucleus caudalis convergent neurones. *Brain Res.* 1984; 321:165-8.
137. Villanueva L, Bouhassira D, Bing Z, Le Bars D. Convergence of heterotopic nociceptive information onto subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. *J Neurophysiol.* 1988; 60:980-1009.
138. Guy N, Voisin D, Mulliez A, Clavelou P, Dallel R. Medication overuse reinstates conditioned pain modulation in women with migraine. *Cephalalgia.* 2018; 38:1148-58.
139. Holstege G. Some anatomical observations on the projections from the hypothalamus to brainstem and spinal cord: an HRP and autoradiographic tracing study in the cat. *J Comp Neurol.* 1987; 260:98-126.
140. Abdallah K, Artola A, Monconduit L, Dallel R, Luccarini P. Bilateral descending hypothalamic projections to the spinal trigeminal nucleus caudalis in rats. *PLoS One.* 2013; 8:e73022.

141. Robert C, Bourgeois L, Arreto CD, Condes-Lara M, Nosedá R, Jay T et al. Paraventricular hypothalamic regulation of trigeminovascular mechanisms involved in headaches. *J Neurosci.* 2013; 33:8827-40.
142. Charbit AR, Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J Neurosci.* 2009; 29:12532-41.
143. Deschênes M, Veinante P, Zhang ZW. The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998; 28:286-308.
144. Krupa DJ, Ghazanfar AA, Nicolelis MA. Immediate thalamic sensory plasticity depends on corticothalamic feedback. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:8200-5.
145. Nosedá R, Constandil L, Bourgeois L, Chalus M, Villanueva L.J Changes of meningeal excitability mediated by corticotrigeminal networks: a link for the endogenous modulation of migraine pain. *J Neurosci.* 2010; 30:14420-9.
146. Sessle BJ, Hu JW, Dubner R, Lucier GE. Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn).II. Modulation of responses to noxious and nonnoxious stimuli by periaqueductal gray, nucleus raphe magnus, cerebral cortex, and afferent influences, and effect of naloxone. *J Neurophysiol.* 1981; 45:193-207.
147. Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science.* 1985; 229:1094-7.
148. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature.* 1982; 298:240-4.
149. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014; 94:1099-142.
150. Benarroch EE. CGRP: Sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology.* 2011; 77:281-7.
151. Edvinsson L, Warfvinge K. Recognizing the role of CGRP and CGRP receptors in migraine and its treatment. *Cephalalgia.* 2019; 39:366-73.
152. Eftekhari S, Warfvinge K, Blixt FW, Edvinsson L. Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. *J Pain.* 2013; 14:1289-303.

153. Lennerz JK, Rühle V, Ceppa EP, Neuhuber WL, Bunnett NW, Grady EF et al. Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *J Comp Neurol.* 2008; 507:1277-99.
154. Eftekhari S, Salvatore CA, Calamari A, Kane SA, Tajti J, Edvinsson L. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience.* 2010; 169:683-96.
155. Eftekhari S, Edvinsson L. Possible sites of action of the new calcitonin gene-related peptide receptor antagonists. *Ther Adv Neurol Disord.* 2010; 3:369-78.
156. Eftekhari S, Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1-level. *BMC Neurosci.* 2011;12:112
157. Warfvinge K, Edvinsson L. Distribution of CGRP and CGRP receptor components in the rat brain. *Cephalalgia.* 2019; 39:342-53.
158. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol.* 1988; 23:193-6.
159. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol.* 1990; 28:183–7.
160. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol.* 1993; 33:48-56.
161. Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G et al. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia.* 1995; 15:384-90.
162. 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; 79:474-9.
163. Sarchielli P, Pini LA, Zanchin G, Alberti A, Maggioni F, Rossi C et al. Clinical-biochemical correlates of migraine attacks in rizatriptan responders and non-responders. *Cephalalgia.* 2006; 26:257-65.
164. Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, Iversen HK, Schifter S, Olesen J. No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol.* 2005; 58:561-8.

165. Edvinsson L, Ekman R, Goadsby PJ. Measurement of vasoactive neuropeptides in biological materials: problems and pitfalls from 30 years of experience and novel future approaches. *Cephalalgia*. 2010; 30:761–66.
166. 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; 128:209-14.
167. 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; 86:133-8.
168. 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; 17:187-93.
168. Van Dongen RM, Zielman R, Noga M, Dekkers OM, Hankemeier T, van der Maagdenberg AM et al. Migraine biomarkers in cerebrospinal fluid: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia*. 2017; 37:49–63.
169. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Jansen-Olesen I, Olesen J. Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache. *Neurology*. 2000; 55:1335-40.
170. 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.
171. Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M. Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia*. 2010;30:1179–86.
172. Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med*. 2004; 350:1104–10.
173. Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, Jones CJ et al. Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology*. 2008; 70:1304-12.
174. Russo AF. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015; 55:533-52.
175. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev*. 2004; 84:903–34.
176. Zhang Z, Winborn CS, Marquez de Prado B, Russo AF. Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion. *J. Neurosci*. 2007; 27:2693.

177. Ottosson A, Edvinsson L. Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. *Cephalalgia*. 1997; 17:166–74.
178. Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A. The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res. Rev.* 2005; 49:65–76.
179. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2001; 429:23–37.
180. Schain A, Burstein R. Sensitization and photophobia in migraine. En: Dalkara T, Moskowitz MA, editors. *Neurobiological basis of migraine*. Wiley-Blackwell; 2017. p. 125-138.
181. Bowen EJ, Schmidt TW, Firm CS, Russo AF, Durham PL. Tumor necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression and secretion from rat trigeminal ganglion neurons. *J Neurochem.* 2006; 96:65-77.
182. Bowen EJ, Schmidt TW, Firm CS, Russo AF, Durham PL. Tumor necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression and secretion from rat trigeminal ganglion neurons. *J Neurochem.* 2006; 96:65-77.
183. Giniatullin R, Nistri A, Fabbretti E. Molecular mechanisms of sensitization of pain-transducing P2X3 receptors by the migraine mediators CGRP and NGF. *Mol. Neurobiol.* 2008;37:83–90.
184. Simonetti M, Giniatullin R, Fabbretti E. Mechanisms mediating the enhanced gene transcription of P2X3 receptor by calcitonin gene-related peptide in trigeminal sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 2008;283:18743–52.
185. Marvizón JCG, Pérez OA, Song B, Chen W, Bunnett NW, et al. Calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in the rat dorsal horn: localization in glutamatergic presynaptic terminals containing opioids and adrenergic  $\alpha 2C$  receptors. *Neuroscience.* 2007; 148:250–65.
186. Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009;194:451–91.
187. Han JS, Adwanikar H, Li Z, Ji G, Neugebauer V. Facilitation of synaptic transmission and pain responses by CGRP in the amygdala of normal rats. *Mol Pain.* 2010; 6:10.
188. Russo AF, Recker A. Unanswered questions in headache: So what is photophobia, anyway? *Headache.* 2013;53:1677–8.
189. Recker A, Kaiser EA, Kuburas A, Russo AF. Induction of multiple photophobic behaviors in a transgenic mouse sensitized to CGRP. *Neuropharmacology.* 2010;58:156–65.



190. Recober A, Kuburas A, Zhang Z, Wemmie JA, Anderson MG, Russo AF. Role of calcitonin gene-related peptide in light-aversive behavior: implications for migraine. *J. Neurosci.* 2009;29:8798–804.
191. Summ O, Charbit AR, Andreou AP, Goadsby PJ. Modulation of nociceptive transmission with calcitonin gene-related peptide receptor antagonists in the thalamus. *Brain.* 2010;133:2540–8.
192. Raddant AC, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation. *Expert Rev. Mol. Med.* 2011;13:e36.
193. Kosaras B, Jakubowski M, Kainz V, Burstein R. Sensory innervation of the calvarial bones of the mouse. *J Comp Neurol.* 2009; 515:331–48.
194. Colonna DM, Meng W, Deal DD, Busija DW. Calcitonin gene-related peptide promotes cerebrovascular dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol.* 1994; 266:H1095–102.
195. Tozzi A, de Iure A, Di Filippo M, Costa C, Caproni S, Pisani et al. Critical role of calcitonin gene-related peptide receptors in cortical spreading depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:18985-90.
196. Raddant AC, Russo AF. Reactive oxygen species induce procalcitonin expression in trigeminal ganglia glia. *Headache.* 2014;54:472–84.
197. Freitag FG. Importance of botulinum toxin for prevention of migraine. *Expert Rev Neurother.* 2010; 10: 339-40.
198. Binder WJ, Blitzer A, Brin MF. Treatment of hyperfunctional lines of the face with botulinum toxin A. *Dermatol Surg.* 1998; 24:1198–205.
199. Dolly JO. Therapeutic and research exploitation of botulinum neurotoxins. *Eur J Neurol.*1997; 4:S5-10.
200. Aoki KR. Botulinum toxin: a successful therapeutic protein. *Curr Med Chem.* 2004; 11:3085-92.
201. Marmura MJ, Silberstein SD. Current understanding and treatment of headache disorders: five new things. *Neurology.* 2011; 76:S3-16.
202. Silberstein SD, Göbel H, Jensen R, et al. Botulinum toxin type A in the prophylactic treatment of chronic tension-type headache: a multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study. *Cephalalgia.* 2006; 26:790–800.
203. Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology.* 2005; 26:785–93.

204. Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, et al. Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A. *Neurobiol Dis.* 2012; 48:367–78.
205. Mazzocchio R, Caleo M. More than at the neuromuscular synapse: actions of botulinum neurotoxin A in the central nervous system. *Neuroscientist.* 2015; 21:44–61.
206. Mathew NT, Frishberg BM, Gawel M, Dimitrova R, Gibson J, Turkel C; Botox CDH Study Group. Botulinum toxin type A (Botox) for the prophylactic treatment of chronic daily headache: a randomized, doubleblind, placebocontrolled trial. *Headache.* 2005; 45:293-307.
207. Freitag FG, Diamond S, Diamond M, Urban G. Botulinum toxin type A in the treatment of chronic migraine without medication overuse. *Headache* 2008; 48:201-9.
208. Aurora SK, Dodick DW, Turkel CC, DeGryse RE, Silberstein SD, Lipton RB, et al; PREEMPT 1 Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the doubleblind, randomized, placebocontrolled phase of the PREEMPT 1 trial. *Cephalalgia.* 2010; 30:793-803.
209. Diener HC, Dodick DW, Aurora SK, Turkel CC, DeGryse RE, Lipton RB, et al; PREEMPT 2 Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the doubleblind, randomized, placebocontrolled phase of the PREEMPT 2 trial. *Cephalalgia.* 2010; 30:804-14.
210. Domínguez C, Vieites-Prado A, Pérez-Mato M, Sobrino T, Rodríguez-Osorio X, López A et al. CGRP and PTX3 as predictors of efficacy of onabotulinumtoxin type A in chronic migraine: an observational study. *Headache.* 2018; 58:78-87.
211. Lee MJ, Lee SY, Cho S, Kang ES, Chung CS. Feasibility of serum CGRP measurement as a biomarker of chronic migraine: a critical reappraisal. *J Headache Pain.* 2018;19:53.
212. Munksgaard SB, Ertsey C, Frandsen E, Bendtsen L, Tekes K, Jensen RH. Circulating nociceptin and CGRP levels in medication-overuse headache. *Acta Neurol Scand.* 2019;139:269-75.
213. Ashina M, Bendsten L, Jensen R, Schiffer S, Olesen J. Calcitonin gene-related peptide levels in chronic tension-type headache. *Neurology.* 2000; 55:1335-40.
214. Fanciullacci M, Alessandri M, Figini M, Geppeti P, Michelacci S. Increase in plasma calcitonin gene-related peptide from extracerebral circulation during nitroglycerin-induced cluster headache attack. *Pain.* 1995; 60:119-23.
215. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache: neuro- peptide changes and effects of acute attack therapies. *Brain.* 1994; 117:427–34.

216. Frese A, Schilgen M, Edvinsson L, Frandsen E, Evers S. Calcitonin gene-related peptide in cervicogenic headache. *Cephalalgia*. 2005; 25:700–3.
217. Rosenberg JH, Silberstein SD. The headache of SAH responds to sumatriptan. *Headache*. 2005; 45:597-8.
218. Diener HC, Bussone G, Van Oene JC, Lahaye M, Schwalen S, Goadsby PJ; TOPMAT-MIG-201(TOP-CHROME) Study Group. Topiramate reduces headache days in chronic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cephalalgia*. 2007; 27:814–23.
219. Yurekli VA, Akhan G, Kutluhan S, Uzar E, Koyuncoglu HR, Gultekin F. The effect of sodium valproate on chronic daily headache and its groups. *J Headache Pain*. 2008; 9:37-41.
220. Domínguez C, Pozo-Rosich P, Torres-Ferrús M, Hernández-Beltrán N, Jurado-Cobo C, González-Oria C et al. OnabotulinumtoxinA in chronic migraine: predictors of response. A prospective multicentre descriptive study. *Eur J Neurol*. 2018; 25:411-6.
221. Aurora S, Winner P, Freeman MC, et al. OnabotulinumtoxinA for the treatment of chronic migraine: Pooled analysis of the 56-week PREEMPT clinical program. *Headache*. 2011; 51:1358-73.

## **VIII. ANEXOS**



# Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine

Eva Cernuda-Morollón,  
PhD  
Davinia Larrosa, MD  
César Ramón, MD  
Juan Vega, MD  
Pablo Martínez-Cambor,  
PhD  
Julio Pascual, MD, PhD

Correspondence to  
Dr. Pascual:  
juliopascual@telefonica.net

## ABSTRACT

**Objective:** To determine calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels outside migraine attacks in peripheral blood as a potential biomarker for chronic migraine (CM).

**Methods:** Women older than 17 years and diagnosed with CM were recruited. Matched healthy women with no headache history and women with episodic migraine (EM) served as control groups, together with a series of patients with episodic cluster headache in a pain-free period. CGRP levels were determined in blood samples obtained from the right antecubital vein by ELISA outside a migraine attack and having taken no symptomatic medication the day before. For ethical reasons, preventatives were not stopped.

**Results:** We assessed plasma samples from 103 women with CM, 31 matched healthy women, 43 matched women with EM, and 14 patients with episodic cluster headache matched for age. CGRP levels were significantly increased in CM (74.90 pg/mL) as compared with control healthy women (33.74 pg/mL), women with EM (46.37 pg/mL), and patients with episodic cluster headache (45.87 pg/mL). Thresholds of 43.45 and 58.22 pg/mL optimize the sensitivity and specificity to differentiate CM from healthy controls and EM, respectively. In the CM group, CGRP levels were significantly increased in women with a history of migraine with aura vs those only experiencing migraine without aura. Variables such as age, analgesic overuse, depression, fibromyalgia, vascular risk factors, history of triptan consumption, or kind of preventative treatment did not significantly influence CGRP levels.

**Conclusion:** Increased CGRP level measured in peripheral blood outside migraine attacks and in the absence of symptomatic medication could be a biomarker helping in the diagnosis of CM.

*Neurology*® 2013;81:1–6

## GLOSSARY

**AUC** = area under the curve; **CGRP** = calcitonin gene-related peptide; **CI** = confidence interval; **CM** = chronic migraine; **EM** = episodic migraine; **IHS** = International Headache Society; **ROC** = receiver operating characteristic.

Migraine can be divided into 2 types of frequency: episodic migraine (EM) (fewer than 15 headache days per month) and chronic migraine (CM) (15 or more headache days per month). The International Headache Society (IHS) defines CM as 15 or more headache days per month for at least 3 months, with 8 or more days per month fulfilling migraine criteria, in the absence of medication overuse.<sup>1</sup>

Migraine is considered to be a neurovascular disorder. Either changes in the modulating nociceptive inputs from the raphe and locus ceruleus nuclei in the brainstem or a cortical spreading depression phenomenon are thought to activate the trigeminovascular system.<sup>2</sup> During a migraine attack, trigeminal activation results in the release of vasoactive neuropeptides from its presynaptic nerve terminals, most especially calcitonin gene-related peptide (CGRP), which induces vasodilation and neurogenic inflammation in leptomeningeal and extracranial vessels giving rise to the typical throbbing migraine pain.<sup>3–5</sup> Although the source of pain persistence in CM is unknown, it is widely accepted that pain pathways become sensitized by repeated episodes of trigeminal activation.<sup>6,7</sup> CGRP has an important role in migraine.<sup>8,9</sup> CGRP is the only neurotransmitter reliably released in acute migraine attacks at present, IV CGRP causes headache only in patients with migraine, and CGRP antagonists are effective for the acute treatment of migraine.<sup>9–12</sup> CGRP is a neuropeptide

Editorial, page xxx

Supplemental data at  
[www.neurology.org](http://www.neurology.org)

From Neuroscience Area, Service of Neurology and Faculty of Medicine, University Hospital Central de Asturias and INEUROPA (E.C.-M, D.L., C.R., J.V., J.P.), and Oficina de Investigación Biosanitaria OIB (P.M.-C), Oviedo, Asturias, Spain.

Go to [Neurology.org](http://Neurology.org) for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article.

consisting of 37 amino acids predominantly expressed in the nervous system. Almost half of the cell bodies of human trigeminal ganglia contain CGRP.<sup>8,9</sup>

We determined interictal CGRP levels in peripheral blood in a series of women with CM as a potential biomarker for permanent trigemino-vascular activation.

**METHODS Study participants.** Women older than 17 years attending our headache clinic at the University Hospital Central de Asturias who had been diagnosed by us as having CM according current IHS criteria were included in this study.<sup>1</sup> All patients fulfilling criteria for analgesic overuse had been detoxified at least once for a minimum of 2 months. As control groups, we recruited matched healthy women (medical students, residents, nurses, or physicians from our hospital) with subjective absence of headache and taking no medication and women also attending our clinic and meeting IHS diagnostic criteria for EM diagnosis. As an ancillary control group, we also studied patients with episodic cluster headache always outside a symptomatic period. All subjects underwent a general physical and neurologic examination. Without exception, migraine (chronic or episodic) had at least a normal neuroimaging study (brain MRI in 97 cases and brain CT with contrast in the remaining 49 cases). All episodic cluster headache cases had a normal brain MRI. Exclusion criteria were pregnant or breast-feeding women, excessive use of alcohol, and serious, active somatic, or psychiatric diseases.

**Standard protocol approvals, registrations, and patient consents.** The study was approved by the institutional ethic review board of our center, and all the participants gave written consent.

**Procedures.** Patients rested in supine position and blood samples were obtained from the right antecubital vein between 9:30 AM and noon in a fasting condition. The blood was collected, allowed to clot, and serum was separated after centrifugation for 10 minutes at 2,000g. Aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. All samples were obtained in the absence of acute moderate-severe pain and having taken no symptomatic medication in the previous 24 hours. Fore ethical reasons, preventatives were not withdrawn.

Serum CGRP levels were determined using a commercial ELISA kit (USCN Life Science Inc., Hubei, China) strictly following manufacturer's instructions. Absorption levels were measured with a spectrophotometer from BioRad (Hercules, CA). The detection limit of the assay was  $<4.3$  pg/mL.

**Data analysis.** CGRP levels and age (years) were described by mean  $\pm$  SDs. Absolute and relative frequencies were used for describing categorical variables. The classic nonparametric Mann-Whitney and the exact  $\chi^2$  test were used to compare, respectively, the CGRP levels and the categorical variables by the different groups. The receiver operating characteristic (ROC) curve and the AUC (area under ROC curve) were obtained to measure the discrimination capacity (CM vs controls and CM vs EM) of the CGRP levels. The point associated with the Youden index was chosen as threshold point. Confidence band for the ROC curves and 95% confidence intervals (CIs) for both the AUC and the threshold were computed by 10,000 iterations of the bootstrap method. Finally, to check the diagnostic capacity of the proposed criteria, the leave-one-out method was performed.

**RESULTS** We assessed plasma samples from 103 women with CM (mean age  $43.1 \pm 11.7$  years; range 18–65 years), 31 healthy women with no headache

history ( $38.6 \pm 12.8$  years; 21–61 years), 43 women with EM ( $44.4 \pm 11.6$  years; 18–66 years), and 14 patients with episodic cluster headache (13 males,  $45.4 \pm 7.9$  years). By history, the average time in which patients had remained in a CM situation was  $9.5 \pm 8.4$  years (range 1–35 years). Comorbidities and treatment of women with CM enrolled in this study are illustrated in the table.

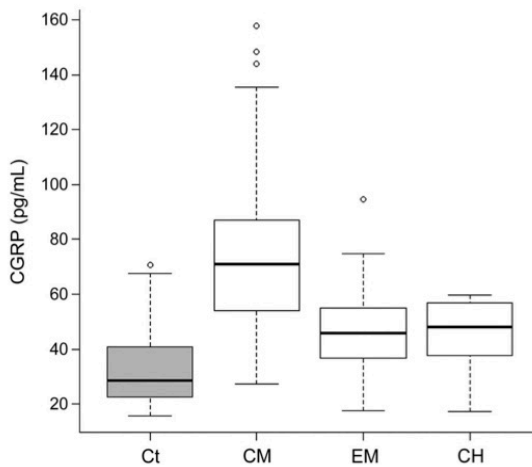
CGRP levels were significantly higher in women with CM ( $74.90 \pm 28.29$  pg/mL; range 29.0–157.72) as compared with control women ( $33.74 \pm 16.10$  pg/mL; range 15.53–70.75;  $p < 0.001$ ), women with EM ( $46.37 \pm 15.21$  pg/mL; range 17.55–94.73;  $p < 0.001$  vs CM and  $p < 0.005$  vs controls), and patients with episodic cluster headache ( $45.87 \pm 12.32$  pg/mL) in an interictal period (figure 1). Both in the group of healthy controls and in the CM group, CGRP was not influenced by age in the range of our study (figure e-1 on the *Neurology*<sup>®</sup> Web site at [www.neurology.org](http://www.neurology.org)).

| Table  | Summary of clinical characteristics of our patients with CM |
|--|---|
| Aura   | 46 (44.7)   |
| <b>Comorbidities</b>                                   |   |
| Arterial hypertension                                  | 15 (14.6)   |
| Hypercholesterolemia                                   | 19 (18.5)   |
| Depression   | 52 (50.5)   |
| Fibromyalgia   | 13 (12.6)   |
| <b>Others</b>  |   |
| Obesity  | 6   |
| Asthma   | 5   |
| Lupus  | 1   |
| Epilepsy   | 1   |
| <b>Analgesic overuse</b>                               | 26 (25.2)   |
| <b>Preventatives</b>                                   |   |
| Topiramate   | 52 (50.5)   |
| $\beta$ -Blockers                                      | 24 (23.3)   |
| Flunarizine  | 1 (0.97)  |
| Amitriptyline  | 34 (33.0)   |
| SSRIs  | 12 (11.7)   |
| ACE inhibitors   | 23 (22.3)   |
| Zonisamide   | 13 (12.6)   |
| Valproic acid  | 6 (5.8)   |
| <b>Polytherapy (<math>\geq 2</math> preventatives)</b> | 58 (56.3)   |
| <b>Symptomatic treatment</b>                           |   |
| Triptans   | 76 (73.8)   |
| NSAIDs   | 74 (71.8)   |

Abbreviations: ACE = angiotensin-converting enzyme; CM = chronic migraine; NSAIDs = nonsteroidal anti-inflammatory drugs; SSRIs = selective serotonin reuptake inhibitors. Data are n (%).



**Figure 1** CGRP levels are increased in chronic migraine

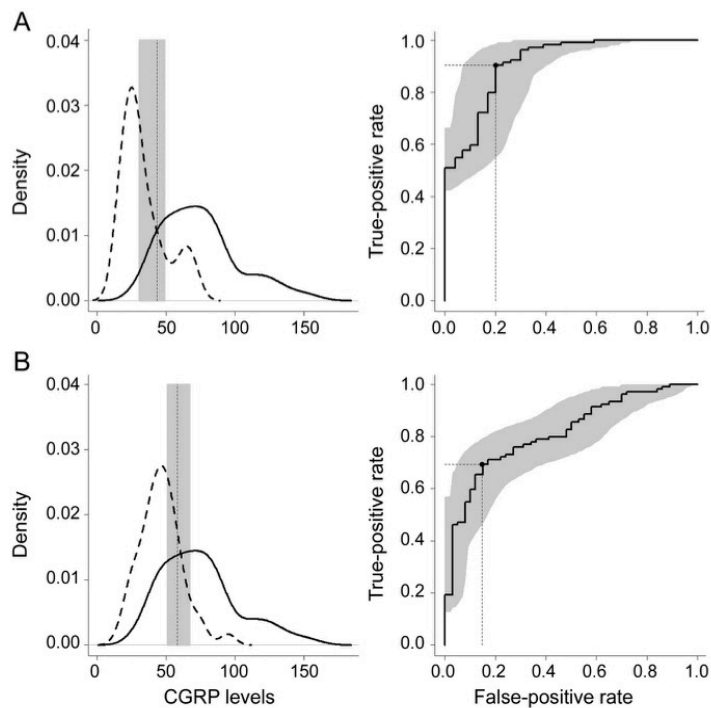


Box plot for the calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels in controls (Ct, gray), chronic migraine (CM), episodic migraine (EM), and cluster headache (CH).

To evaluate the CGRP concentration as a potential marker for CM, the ROC curve and the AUC were measured. The Youden index was achieved for a CGRP concentration of 43.45 pg/mL (95% bootstrap CI: 30.91–49.06; figure 2A) with an AUC of 0.912 (95% bootstrap CI: 0.8499–0.9640). For this threshold, 90.38% of the patients with CM and 80.64% of the controls would be correctly classified. The same discriminatory capacity was obtained by applying the leave-one-out method. Thereafter, the same methodology was applied to discriminate CM and EM. For a CGRP concentration of 58.22 pg/mL (95% bootstrap CI: 51.31–67.09), 69.23% of the patients with EM and 85.7% of the patients with CM were correctly classified (figure 2B).

A total of 46 women (44.66%) with CM had a history of migraine with aura attacks. There were only 4 women in this group experiencing aura at least once per month in the previous year. Within the sample of women with EM, 21 (48.84%) also had a history of migraine with aura attacks. CGRP levels were also significantly increased in the 46 women with CM and a history of migraine with aura attacks ( $81.29 \pm 27.11$  pg/mL;

**Figure 2** ROC-curve threshold for CGRP



(A) Left panel: kernel density estimations for the calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels in chronic migraine (CM) (continuous line) and controls (dotted line). Vertical line stands for the threshold that achieves the Youden index. A 95% bootstrap confidence interval is in gray. Right panel: respective receiver operating characteristic (ROC) curve with 95% bootstrap confidence band. The results of the threshold are highlighted. (B) Similar to (A) for CM (continuous line) and episodic migraine (dotted line).



range 27.44–148.39) vs those 57 women experiencing only migraine without aura attacks ( $69.65 \pm 28.39$  pg/mL; range 29.0–157.7;  $p = 0.013$ ). In women with EM, there was no significant CGRP elevation in the 21 women with aura ( $48.73 \pm 12.82$  pg/mL; range 22.7–77.0) compared with the 22 with no aura antecedents ( $44.12 \pm 17.18$  pg/mL; range 17.6–94.7) (figure 3).

In the group of women with CM, CGRP levels were not significantly different in patients meeting criteria for analgesic overuse (26 patients, 25.2%) vs those without analgesic overuse ( $72.70 \pm 30.46$  pg/mL vs  $74.93 \pm 27.68$  pg/mL). CGRP levels were not statistically different in patients using triptans as symptomatic medication as compared with those who were not taking triptans. CGRP levels were not statistically different in patients taking preventatives in monotherapy vs polytherapy or in those taking topiramate vs those who were not using topiramate. In this group, CGRP levels did not change significantly in the presence/absence of a history of depression, fibromyalgia, and arterial hypertension.

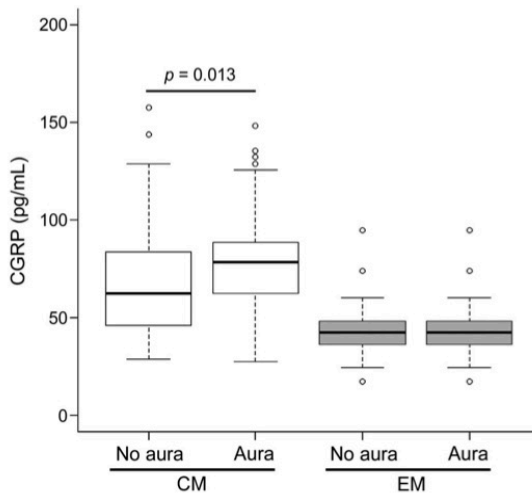
**DISCUSSION** The main finding of this work is that, as compared with healthy women without a history of headache, interictal CGRP levels were clearly elevated in peripheral blood in a large series of women with CM and, to a lesser degree, in women with EM. CGRP levels in patients with CM were shown to be significantly increased when compared with those of women with EM. Increased peripheral CGRP levels should be interpreted as a distant sign of activation of the trigeminovascular system; because its molecule is so large, CGRP cannot pass the blood-brain barrier.<sup>8,9</sup>

There have been only a few studies testing CGRP levels in migraine with contradictory results. While 2 works were able to detect a specific increased release of CGRP in the external jugular vein during the acute migraine attack,<sup>4,13</sup> which was reversed by the administration of triptans, another study found no CGRP increase during migraine attacks also in jugular venous samples.<sup>14</sup> In this negative study, the researcher visited patients at their home or workplace and the time between sampling and centrifugation has been considered as too prolonged, which, considering the rather short half-life of CGRP, would predict little neuro peptide left in the sample.<sup>15</sup> Because of the obvious difficulties in obtaining jugular vein samples, several groups have already measured CGRP levels in peripheral blood in small series of patients with migraine. CGRP levels have been found consistently elevated during migraine attacks as compared with controls in cubital vein samples.<sup>16,17</sup> Interestingly, an increase in peripheral CGRP levels in interictal, headache-free periods has been detected in patients with EM recruited from specialized headache clinics.<sup>18,19</sup> Similar results have been obtained measuring salivary levels of CGRP in migraine subjects between attacks.<sup>20,21</sup>

There are no data on CGRP blood levels in patients with CM. Higher levels were found in the CSF of patients with CM with and without medication overuse as compared with controls in one study.<sup>22</sup> There was no difference in interictal plasma levels of CGRP in patients with chronic tension-type headache and healthy control subjects in one study, but an exploratory analysis showed that 8 patients whose usual headache quality was throbbing, who would probably have been diagnosed according to the 2006 criteria as having CM, had significantly higher antecubital CGRP levels than control subjects.<sup>23</sup> Our results show for the first time increased CGRP levels in CM outside migraine attacks and in the absence of symptomatic medication for at least 24 hours. Although we are aware that the fact that, for ethical reasons, most of our patients with migraine were receiving daily preventatives could be considered as a limitation of this study, it is also true that this could make our results even more relevant because these drugs could reduce to some degree trigeminovascular system activation and as a consequence decrease CGRP release. At least theoretically, peripheral CGRP levels could also serve to objectively contribute to monitor migraine status and response to preventive treatments. As an example of this, 14 of the 43 women in a current EM situation had met in the past CM criteria, which could be reversed with preventive treatments. Mean CGRP levels in this subset of patients was 39.7 pg/mL, that is, in the range of EM and far from that of CM.

CGRP levels were significantly higher in women with CM having a history of migraine with aura attacks vs those who had never experienced an aura. A similar tendency was suggested in 2 of the studies examining

**Figure 3** Influence of aura on CGRP levels



Box plot for the calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels in chronic migraine (CM) and episodic migraine (EM) (in gray) by aura vs no aura.

CGRP levels in patients with migraine coming to specialized headache clinics.<sup>16–19</sup> There are several potential explanations for this increased level of CGRP in women with CM and a history of aura. First, it would support the proposal that the pathophysiologic mechanism of the aura, the cortical spreading depression phenomenon, is enough to activate sensory nerve terminals around pial blood vessels.<sup>24</sup> Second, it is also possible that aura develops in general attacks with more severe pain.<sup>25</sup> In contrast to these 2 explanations, although a history of aura was rather common in our CM series, there were only 4 patients experiencing at least 1 aura per month. Finally, it is possible that the reason for our results could be that aura works as an ideal marker for a sure migraine diagnosis.

A variety of clinical comorbidities did not correlate, even numerically, with a change in CGRP levels. Interestingly, CGRP levels were remarkably similar in CM women with and without analgesic overuse. Even considering that all of the women in our study with CM meeting overuse criteria had tried formal withdrawal of symptomatic medications at least once and for 2 months without success, these results are a further proof that both subtypes of CM, with and without analgesic overuse, would share the same pathophysiologic substrate.

We still do not have a good understanding of the pathophysiology of CM or of the exact mechanisms that lead to transformation from EM to CM. It is well established, however, that activation of the trigeminovascular system has a crucial role and leads to afferent and efferent release of neuropeptides, especially CGRP. This facilitates a peripheral inflammatory and vasodilating response and causes activation of second-order neurons involved in pain transmission. In most vessels, CGRP causes endothelium- and nitric oxide-independent vasodilation through a direct action on the smooth muscle cells mediated both by cyclic adenosine monophosphate and activation of adenosine triphosphate-dependent  $K^+$  channels.<sup>26,27</sup> Persistent release of CGRP is thought to induce sensitization of central trigeminal neurons triggering a signaling pathway mediated by brain-derived neurotrophic factor leading to increased expression of a gene encoding the P2X receptors.<sup>28,29</sup> These peptidergic central neurons in dorsal horn and trigeminal nucleus caudalis use L-glutamate as their primary neurotransmitter. CGRP, acting via a unique receptor complex, increases neurotransmitter release at these levels, which would lead to central sensitization underlying chronic pain states such as CM.<sup>5,6</sup>

What could be the clinical utility of our results? Peripheral CGRP levels outside migraine attacks and in the absence of symptomatic medication seem to be a reliable biomarker for CM allowing us to monitor patient status and perhaps response to preventive treatment, which could be of great help, for instance, for a more objective follow-up of patients included in clinical

trials. Is this interictal increase in CGRP levels specific for CM vs other headaches? CGRP levels have been shown to be increased during attacks in patients with cluster headaches,<sup>30</sup> but there are no published data showing a role for CGRP as a biomarker for these headaches in headache-free periods. Our preliminary analysis in 14 patients with episodic cluster headache (13 males) shows that interictal CGRP levels are in the range of EM and do not reach those seen for CM.<sup>30</sup> CGRP levels have already been found to be similar to those of controls without headache in 2 important differential diagnoses for CM: chronic tension-type headache,<sup>23</sup> and cervicogenic headache.<sup>31</sup>

This study has some limitations. First, our results come from a selected headache clinic population with still a limited number of patients and healthy controls. Second, the actual value of CGRP levels for monitoring the status of patients with migraine would only be possible with longitudinal data. Finally, to demonstrate true specificity, CGRP levels should be studied in entities such as new daily persistent headache, hemicrania continua, and in several secondary headaches that can mimic a CM phenotype. Keeping these limitations in mind, it seems that interictal CGRP levels are somewhat specific and sensitive for CM in the context of a patient with a daily or almost daily headaches and a history of migraine, which could be of great help on sharpening the diagnosis of the primary headache disorders and supports the proposal for a key role of CGRP of sensitization of pain circuits leading to CM.<sup>9</sup>

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. E. Cernuda-Morollón: laboratory determinations and critical revision of the manuscript for important intellectual concept. Dr. D. Larrosa: acquisition of data and critical revision of the manuscript for important intellectual concept. Dr. C. Ramón: acquisition of data and critical revision of the manuscript for important intellectual concept. Dr. J. Vega: acquisition of data and critical revision of the manuscript for important intellectual concept. Dr. P. Martínez-Cambor: statistical analysis. Dr. J. Pascual: study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation, and study supervision.

#### STUDY FUNDING

Supported by the P111/00889 FISSS grant (Fondos Feder, ISCIII, Ministry of Education, Spain).

#### DISCLOSURE

E. Cernuda-Morollón, D. Larrosa, C. Ramón, J. Vega, and P. Martínez-Cambor report no disclosures. J. Pascual served on the scientific advisory boards of Allergan and MSD. Go to [Neurology.org](http://Neurology.org) for full disclosures.

Received February 15, 2013. Accepted in final form April 25, 2013.

#### REFERENCES

1. Olesen J, Bousser MG, Diener HC, et al. New appendix criteria open for a broader concept of chronic migraine. *Cephalalgia* 2006;26:742–746.
2. Moskowitz MA. The visceral organ brain: implications for the pathophysiology of vascular head pain. *Neurology* 1991;41:182–186.
3. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and



- neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol* 1993;33:48–56.
4. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 1990;28:183–187.
  5. Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48:438–456.
  6. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 1996;384:560–564.
  7. Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol* 2009;451–491.
  8. Benarroch EE. CGRP: sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology* 2011;77:281–287.
  9. Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat Rev Neurol* 2010;6:573–582.
  10. 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.
  11. Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* 2004;350:1104–1110.
  12. Edvinsson L, Linde M. New drugs in migraine treatment and prophylaxis: telcagepant and topiramate. *Lancet* 2010;376:645–655.
  13. Sarchielli P, Pini LA, Zanchin G, et al. Clinical-biochemical correlates of migraine attacks with rizatriptan responders and non-responders. *Cephalalgia* 2006;26:257–265.
  14. 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.
  15. Edvinsson L, Ekman R, Goadsby PJ. Measurement of vasoactive neuropeptides in biological materials: problems and pitfalls from 30 years of experience and novel future approaches. *Cephalalgia* 2010;30:761–766.
  16. Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, et al. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia* 1995;15:384–390.
  17. 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.
  18. Fusayasu E, Kowa H, Takeshima T, Nakaso K, Nakshima K. Increased plasma substance P and CGRP levels, and high ACE activity in migraineurs during headache-free periods. *Pain* 2007;128:209–214.
  19. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schiffter S, Olesen J. Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain* 2000;86:133–138.
  20. 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.
  21. 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.
  22. Sarchielli P, Alberti A, Floridi A, Gallai V. Levels of growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients. *Neurology* 2001;57:132–134.
  23. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schiffter S, Jansen-Olesen I, Olesen J. Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache. *Neurology* 2000;55:1335–1340.
  24. Boly H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 2002;8:136–142.
  25. Kelman L. The aura: a tertiary care study of 952 migraine patients. *Cephalalgia* 2004;24:728–734.
  26. Li J, Vause CV, Durham PL. Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxide synthesis and release from trigeminal ganglion glial cells. *Brain Res* 2008;1196:22–32.
  27. Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M, Fischer MJM. CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. *Headache* 2012;52:1411–1427.
  28. Giniatullin R, Nistri A, Fabbretti E. Molecular mechanisms of sensitization of pain-transducing P2X<sub>3</sub> receptors by the migraine mediators CGRP and NGF. *Mol Neurobiol* 2008;37:83–90.
  29. Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitization. *Lancet Neurol* 2009;8:679–690.
  30. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache: neuropeptide changes and effects of acute attack therapies. *Brain* 1994;117:427–434.
  31. Frese A, Schilgen M, Edvinsson L, Frandsen E, Evers S. Calcitonin gene-related peptide in cervicogenic headache. *Cephalalgia* 2005;25:700–703.

## Research Submission

### CGRP and VIP Levels as Predictors of Efficacy of Onabotulinumtoxin Type A in Chronic Migraine

Eva Cernuda-Morollón, PhD; Pablo Martínez-Camblor, PhD; César Ramón, MD; Davinia Larrosa, MD; Esther Serrano-Pertierra, PhD; Julio Pascual, MD, PhD

**Background.**—Onabotulinumtoxin type A (onabotA) has shown efficacy in chronic migraine (CM). Its precise mechanism of action, however, is unknown.

**Objective.**—To analyze a potential relationship between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) levels and response to onabotA in CM.

**Methods.**—Adult patients with CM were recruited. Matched healthy subjects with no headache history served as controls. CGRP and VIP levels were determined in samples obtained from the right antecubital vein by ELISA outside of a migraine attack and having taken no symptomatic medication prior to treatment with onabotA. OnabotA was administered according to the PREEMPT protocol every 12 weeks for at least two treatment cycles. A patient was considered as a moderate responder when both: (1) moderate-severe headache episodes were reduced by between 33 and 66%; (2) subjective benefit in a visual scale of 0-100 was recorded by the patient of between 33-66%. Patients were considered as excellent responders when both items improved >66%. Those without improvement of at least one-third in the two items were considered as nonresponders.

**Results.**—We assessed plasma samples from 81 patients with CM and 33 healthy controls. CGRP and VIP levels were significantly increased in CM population vs controls. CGRP and, to a lesser degree, VIP levels were significantly increased in responders vs nonresponders. For CGRP, a threshold of 72 pg/mL positively correlated with 95% of nonresponders. The probability of being a responder to onabotA was 28 times higher in patients with a CGRP level above the threshold of 72 pg/mL. Even though the sensitivity for the calculated threshold for VIP was poor, the probability that CM patients with low CGRP levels will respond to onabotA was significantly higher in those patients with high VIP levels.

**Conclusions.**—Interictal CGRP and, to a lesser degree, VIP levels measured in peripheral blood are of great help in predicting response to onabotA.

**Key words:** calcitonin gene-related peptide, chronic migraine, migraine, vasoactive intestinal peptide

(*Headache* 2014;••:•••••)

From the Neuroscience Area, Service of Neurology, University Hospital Central de Asturias and Ineuropa, Oviedo, Spain (E. Cernuda-Morollón, C. Ramón, D. Larrosa, E. Serrano-Pertierra, and J. Pascual); Oficina de Investigación Sanitaria, Oviedo, Spain (P. Martínez-Camblor).

Address all correspondence to J. Pascual, Neuroscience Area, Service of Neurology, University Hospital Central de Asturias, Calle Celestino Villamil s/n, 33006 Oviedo, Asturias, Spain, email: juliopascual@telefonica.net

Accepted for publication March 21, 2014.

Migraine is considered a neurovascular disorder. Either a cortical spreading depression phenomenon<sup>1</sup> or changes in the modulating nociceptive inputs from the raphe and locus coeruleus nuclei from the brainstem<sup>2</sup> are thought to activate the trigemino-vascular system (TVS), which releases vasoactive

*Conflict of Interest:* Dr. Pascual has served on the advisory board of Allergan. The remaining authors do not hold conflicts of interest.

neuropeptides from the presynaptic nerve terminals, mainly calcitonin gene-related peptide (CGRP) and others, such as vasoactive intestinal peptide (VIP) around leptomeningeal and pericranial vessels.<sup>3,4</sup> The local release of these neuropeptides induces vasodilation and neurogenic inflammation, which gives rise to the typical pulsating migraine pain.<sup>3,5</sup> There are 2 types of migraine in terms of frequency: episodic migraine (EM) (fewer than 15 headaches per month) and chronic migraine (CM) (15 or more headache days per month). The diagnosis of CM is a clinical one. The International Headache Society defines CM as 15 or more headache days per month lasting >4 hours, with at least 8 or more days per month fulfilling migraine criteria.<sup>6</sup> Although the source of pain persistence in CM is not known, it has been suggested that repeated episodes of TVS activation can sensitize central pain pathways and lead to migraine chronification.<sup>7,8</sup> Supporting this concept, our group has recently reported that patients with active CM show increased interictal, peripheral levels of CGRP and, to a lesser degree, VIP.<sup>9,10</sup> The levels of these neuropeptides could therefore be reliable biomarkers helping in a more objective diagnosis of CM.

The efficacy of pericranial injections of onabotulinumtoxin type A (onabotA) for the treatment of CM is well established.<sup>11</sup> However, both its mechanism of action in this condition and potential predictors for response to onabotA in CM are not fully described. The aim of this study has been to analyze a potential relationship between interictal CGRP and VIP levels and response to onabotA treatment in a series of CM patients.

## SUBJECTS AND METHODS

### Study Participants and Evaluation of Efficacy.—

Adults attending our headache clinic who had been diagnosed by us as having CM according to current International Headache Society criteria and treated with onabotA were included in this study.<sup>6</sup> All patients fulfilling criteria for analgesic overuse had been detoxified at least once for a minimum of 2 months. Exclusion criteria were pregnant or breast feeding women, excessive use of alcohol, and serious, active somatic or psychiatric diseases. Patients showing the comorbidities usually seen in CM, such

as anxiety, depression, or fibromyalgia or with common vascular risk factors were not excluded. A detailed medical and headache history was available for all patients, who had attended our headache clinic a minimum of once per trimester during at least 12 months prior to entry in this study. All patients underwent a general physical and neurological examination. All participants had a normal magnetic resonance imaging study. Diagnosis of CM was confirmed by the use of monthly headache calendars in all patients. For the control group, we recruited matched healthy patients (medical students, residents, nurses, or physicians from our hospital) with a subjective absence of headache.

Following current recommendations in our country (Spain),<sup>12</sup> CM patients were considered for onabotA treatment if they have failed, due to either poor efficacy and/or tolerability, treatment with at least 2 prophylactic medications with demonstrated efficacy in migraine, and belonging to different pharmacological groups. In spite of taking oral preventatives, all patients treated with onabotA in this study continued to fulfill CM criteria, but oral preventatives were continued in order to look for a synergistic effect with onabotA. Without exception, we followed the PREEMPT protocol, that is 155-195 onabot U in 31-39 injection sites. All patients who were treated with onabotA received onabotA at least twice over 2 consecutive periods 12 weeks apart. A patient was considered as a moderate responder to onabotA when both: (1) according to the diary, moderate-severe headache episodes longer than 4 hours (or shorter if treated with symptomatic medications) were reduced by between 33 and 66%; (2) a subjective benefit according to a visual scale of 0-100 was also recorded by the patient of between 33 and 66%. Patients were considered as excellent responders when both subjective and objective items improved by more than 66%. Patients without improvement of at least one third in the 2 items were considered as nonresponders. Both patients and neurologists were blinded to the results of laboratory determinations when evaluating the efficacy of onabotA. The protocol was approved by our ethics committee and all patients signed an informed consent.



**Laboratory Procedures.**—CGRP and VIP levels were determined in blood samples obtained before treatment with onabotA in our clinic. Patients rested in a supine position and blood samples were obtained from the right antecubital vein between 9:30 am and noon under fasting conditions in our clinic. The blood was collected, allowed to clot and serum was immediately separated after centrifugation for 10 minutes at 2000 x g. Aliquots were rapidly stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. All samples were obtained in the absence of acute moderate-severe pain and having taken no symptomatic medication in the previous 24 hours.

Serum CGRP and VIP levels were determined using commercial ELISA kits (USCN Life Science Inc, Hubei, China) strictly following manufacturer's instructions. Absorption levels were measured with a spectrophotometer from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The detection limit of the assay was  $<4.3$  pg/mL for CGRP and  $<2.34$  pg/mL for VIP.

**Data Analysis.**—CGRP and VIP levels are described by mean  $\pm$  standard deviation, and quartile ( $P_{25}$ ,  $P_{50}$ , and  $P_{75}$ ) values are also reported. Categorical variables are described by relative and absolute frequencies. The non-parametric k-sample Kruskal-Wallis test was used for the comparison of CGRP and VIP levels among the response group. The receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the curve (AUC) were used to measure the diagnostic quality of the CGRP levels. In addition, the Youden criterion (sensitivity + specificity) was used to compute the optimal threshold. Univariate binary logistic regression was also performed. Univariate odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) are provided. Only the CGRP level was included in a multivariate binary logistic regression with a forward stepwise based on the likelihood ratio.

## RESULTS

A total of 81 patients fulfilling CM criteria were included in this study. As a control group, 33 healthy women with no headache history ( $39.4 \pm 13.2$  years; 21-61 years) were recruited. The mean age of the CM patients was  $46.2 \pm 11.0$  (range 23-65); only four (4.9%) were males. By history, the average time for which patients had suffered from CM was  $10.2 \pm 7.6$  years. Main comorbidities and treatments taken by

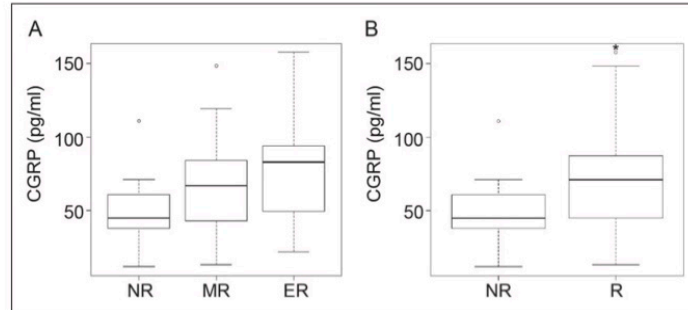
**Table.—Main Characteristics of the CM Population Including Treatments Taken by the Patients During This Study**

|  | N (%)    |
|--|----------|
| Females:                                 | 77 (95%) |
| Migraine type:                           |          |
| Migraine without aura                    | 47 (58%) |
| Migraine with aura                       | 34 (42%) |
| Comorbidities:                           |          |
| Analgesic overuse                        | 35 (43%) |
| Depression                               | 42 (52%) |
| Fibromyalgia                             | 10 (12%) |
| Arterial hypertension                    | 11 (14%) |
| Hypercholesterolemia                     | 19 (23%) |
| Smoking habit                            | 10 (12%) |
| Obesity                                  | 7 (9%)   |
| Pharmacological treatment                |          |
| Non-steroidal anti-inflammatory drugs    | 54 (67%) |
| Triptans                                 | 58 (72%) |
| Topiramate                               | 34 (42%) |
| Amitriptyline                            | 30 (37%) |
| Angiotensin converting enzyme inhibitors | 20 (25%) |
| $\beta$ -blockers                        | 15 (19%) |
| Zonisamide                               | 15 (19%) |
| Other antidepressants                    | 13 (16%) |
| Valproic acid                            | 7 (9%)   |

CM, chronic migraine.

the patients when they were enrolled in this study are illustrated in the Table. Regarding the efficacy of onabotA treatment, 61 patients (75.3%) responded and the remaining 20 patients (24.7%) did not notice any significant response. Among those 61 responders, 41 (50.6%) and 20 (24.7%) showed moderate and excellent response, respectively. A number of demographic factors, clinical features, and comorbidities including age, duration of CM, a history of aura, analgesic overuse, depression, fibromyalgia, arterial hypertension or obesity, and treatment with triptans vs no triptan use, using preventatives in monotherapy vs polytherapy or taking topiramate vs not using topiramate were not significantly, or even numerically, different in patients who responded to onabotA vs those who did not respond.

CGRP levels were significantly increased in CM patients ( $64.9 \pm 31.0$  pg/mL; range 11.4-157.7) as compared with healthy controls ( $33.3 \pm 15.7$  pg/mL; range 15.5-70.8;  $P < 10^{-10}$ ). CGRP levels in nonresponders ( $48.3 \pm 21.2$  pg/mL; range 11.4-110.8;  $P_{25} = 37.51$ ,  $P_{50} = 45.03$ ,  $P_{75} = 61.62$ ) were significantly lower than



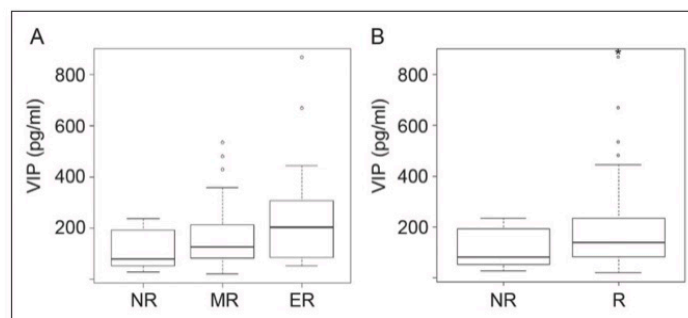
**Fig 1.**—Box plot for the calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels in nonresponders (NR), moderate responders (MR), and excellent responders (ER) (A) or nonresponders (NR) and responders (R) (B) (\* $P < .005$ ).

those in responders ( $70.4 \pm 31.9$  pg/mL; range 12.8-157.7;  $P < .005$ ), but still significantly higher ( $P < .001$ ) than those of healthy controls. CGRP levels in moderate responders ( $66.1 \pm 28.9$  pg/mL; range 12.8-158.4;  $P_{25} = 42.88$ ,  $P_{50} = 67.03$ ,  $P_{75} = 85.48$ ) were numerically lower than those of patients with excellent response ( $79.2 \pm 36.6$ , range 22.0-157.7;  $P_{25} = 48.27$ ,  $P_{50} = 83.14$ ,  $P_{75} = 95.28$ ,  $P = NS$ ) (Fig. 1).

VIP levels were significantly increased in CM patients ( $173.7 \pm 150.7$  pg/mL; range 20.6-866.6) as compared with healthy controls ( $88.5 \pm 62.3$  pg/mL; range 15.5  $\pm$  256.1;  $P < .001$ ). VIP levels in nonresponders ( $115.5 \pm 76.2$  pg/mL; range 29.1-236.4;  $P_{25} = 53.23$ ,  $P_{50} = 80.25$ ,  $P_{75} = 197.31$ ) were significantly lower than those in responders ( $189.7 \pm 162.3$  pg/mL; range 20.6-866.6;  $P < .05$ ), but did not differ from those of controls. VIP levels in moderate responders ( $160.5 \pm 120.9$  pg/mL, range

20.6–534.0;  $P_{25} = 81.52$ ,  $P_{50} = 126.69$ ,  $P_{75} = 213.99$ ) were numerically lower than those of patients with excellent response ( $245.3 \pm 213.6$  pg/mL; range 54.0-866.6;  $P_{25} = 78.88$ ,  $P_{50} = 202.08$ ,  $P_{75} = 309.28$ ,  $P = NS$ ) (Fig. 2). There was no significant correlation between either CGRP or VIP levels, response vs no response to onabotA, and any of the analyzed demographic factors, clinical features, and comorbidities (see above).

To evaluate the CGRP and VIP concentrations as potential predictors of response to onabotA in CM, the ROC curve and the AUC were measured. For CGRP, the optimal cut point (Youden index) was achieved at a concentration of 72 pg/mL with an AUC of 0.714 (95% CI: 0.594-0.833). This threshold would classify correctly 49.2% of responders (sensitivity) and 95.0% of nonresponders (specificity) (Figs. 3 and 4). The probability of being a responder



**Fig 2.**—Box plot for the vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in nonresponders (NR), moderate responders (MR), and excellent responders (ER) (A) or nonresponders (NR) and responders (R) (B) (\* $P < .05$ ).

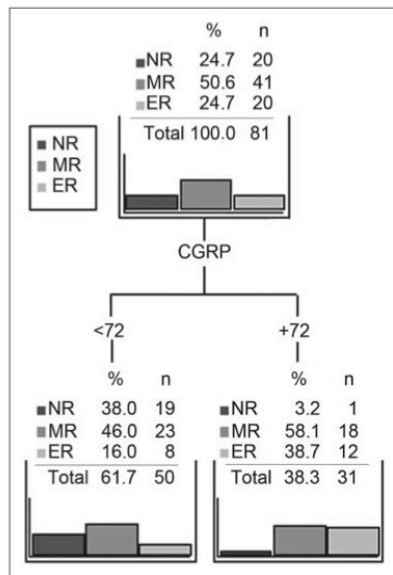


Fig 3.—Classification tree. Optimal threshold was computed based on the Youden index.

to onabotA was 28 (OR: 18.39) times higher in CM patients with a CGRP level above the threshold of 72 pg/mL. When the CGRP level was considered as continuous variable, the OR was 1.032 (95% CI 1.008-1.056), ie, for each unit (pg/mL) of CGRP level, the probability that a patient responds to the treatment is increased a 3.2%. For VIP, the Youden index was achieved at a concentration of 66 pg/mL (AUC 0.659; 95% bootstrap CI: 0.505-0.814). Contrary to CGRP, VIP threshold is sensitive (86.2%) but its specificity was very poor (50%). Consequently, this threshold would correctly classify 86% of CM patients as responders, which is not different from the global rate of response to onabotA in this series (78%). Among those CM patients with CGRP levels below 72 pg/mL, 28% had low VIP levels and just 33.3% responded as compared with 77.4% responders in the remaining 72% who had high VIP levels. Therefore, the probability of being a responder in CM patients with CGRP levels below the threshold was significantly higher in those patients with high VIP levels vs those with low VIP levels (OR: 6.857; 95% CI: 1.583-29.707;  $P = .012$ ). Among CM patients with CGRP

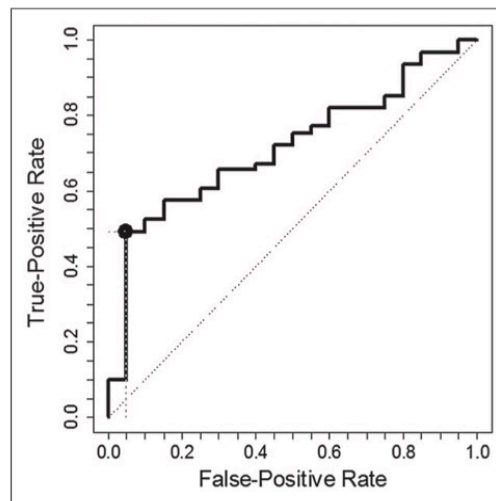


Fig 4.—Receiver operating characteristic (ROC) curve for the calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels. In grey, optimal cut-off point based on the Youden index.

levels above the threshold, there was only one nonresponder who also had high VIP levels.

## DISCUSSION

As already reported by our group using in part subjects included here, this study first confirms that interictal CGRP and VIP levels measured in peripheral blood are increased in a large series of CM patients vs healthy subjects with no headache history. In fact, both CGRP and VIP levels in CM were twice those of controls, which should be interpreted as distant signs of activation of the sensory and parasympathetic arms of the TVS, respectively. The levels of these two neuropeptides, and especially of CGRP due to its lower variability, measured in peripheral blood and outside migraine attacks have been proposed as the first biomarkers helpful for a more objective diagnosis of CM in the context of a patient with daily or almost daily headaches and a history of migraine, which could be of value for a better selection of treatment for CM patients.<sup>9,10</sup>

The impact of CM in terms of quality of life and economic burden is very relevant.<sup>13-15</sup> Treatment of CM is not easy.<sup>14</sup> Even though in clinical practice we use oral preventatives with efficacy in EM, objective



evidence of efficacy in CM is available only for topiramate<sup>16-18</sup> and, to a lesser degree, for valproic acid.<sup>19</sup> It was not until this decade that the efficacy of pericranial injections of 155-195 U of onabotA was shown in two large controlled phase III trials.<sup>11</sup> This efficacy has also been reported in several open studies<sup>20-23</sup> and in this series in which three quarters of our patients showed an objective and subjective response to onabotA injections. The exact mechanism of action of pericranial injections of onabotA leading to migraine prevention is still unclear, and reliable potential predictors of response have not yet been identified. In the pooled analysis of the 2 phase III trials with onabotA in CM, there was no positive correlation between 85 possible clinical predictors and response to onabotA.<sup>11</sup> The main finding of the present work is that interictal CGRP, and to a lesser degree, VIP levels are potentially of great help on predicting response to onabotA. In fact, both CGRP and VIP levels were significantly higher in CM patients responding to onabotA as compared with nonresponders. Due to relatively low numbers of patients, there was no significant difference in patients exhibiting an excellent response as compared with those showing just a moderate response, but both CGRP and VIP were numerically higher in the group who reported an excellent response, again suggesting a relationship between the levels of these two neuropeptides and the rate of response to onabotA. Due to its intrinsic numeric dispersion, the specificity of VIP data is poor. By contrast, CGRP levels are both rather sensitive, very specific, and show a high potency to predict response to onabotA in CM. This is exemplified by two data: first, the optimal CGRP threshold given by the ROC analysis, 72 pg/mL, allows us a correct prediction of response to onabotA in 95% of cases; and second, a CGRP level above this threshold multiplies the probability of response by 28. Taken together, these results indicate that increased CGRP levels, very probably reflecting a continuous activation of the sensory arm of the TVS, are a good biomarker for CM diagnosis and specifically its response to treatment with onabotA injections.

There were, however, CM patients with CGRP levels in the range of controls, 31 patients with CGRP below the threshold who responded (8 of them showed

an excellent response), and there was 1 patient without response to onabotA who had increased CGRP levels. How can these results be interpreted? They suggest that, together with CGRP, there are probably other factors in the pathophysiology of CM,<sup>4,24,25</sup> such as VIP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), or peptide histidine methionine (PHM), which are stored and released by the parasympathetic arm of the TVS.<sup>26</sup> There are several arguments strongly supporting an involvement of the parasympathetic arm of the TVS in migraine pathophysiology, at least in some patients. Cranial autonomic parasympathetic symptoms, such as lacrimation, rhinorrhea, and eyelid edema, do appear, depending on criteria and study design, in 27% to 73% of migraine patients.<sup>27-29</sup> Meningeal blood vessels receive dense parasympathetic innervation.<sup>3,4,26</sup> Activation and sensitization of nociceptors around extra- and intracranial vessels is a primary source of pain in migraine. It has been proposed that parasympathetic outflow to cephalic vasculature may trigger activation and sensitization of perivascular sensory afferents and thereby contribute to migraine pain chronification.<sup>7,25,30,31</sup> Our finding of increased peripheral VIP levels in CM patients outside of migraine attacks could reasonably be interpreted as a distant sign of “permanent” activation of the parasympathetic arm of the TVS, at least in up to three quarters of patients who express parasympathetic symptoms during migraine attacks.<sup>27-29</sup> Supporting a role for VIP at least in some CM patients and their response to onabotA, 7 out of the 8 patients with excellent response to onabotA and CGRP levels below the threshold showed increased VIP levels. Intriguingly, there were 4 patients with both low CGRP and VIP levels who showed clear response to onabotA. Release of other pain producing peptides, such as PHM or PACAP, not measured here could be the first explanation for these results. In fact, PACAP itself is able to induce migraine-like attacks,<sup>31</sup> and very recently, it has been shown that PACAP levels, both ictal and interictally, are elevated in migraine patients.<sup>32</sup> There is also another interesting explanation, of relevance for clinical practice, for these results. In the absence of an objective diagnostic marker, CM diagnosis is based on a clinical picture alone. There could be a group of patients with a phenotype

mimicking that of CM who are actually suffering from other headaches, either primary or secondary. Even after being assessed by an experienced headache neurologist and a magnetic resonance imaging has been performed with normal results, other diagnoses, such as tension-type headache in a previous migraineur or psychogenic headache expressing as CM, are still possibilities, which would explain in part the relevant response to placebo in trials with onabotA.<sup>11</sup> This could be an interesting point to be tested in future placebo-controlled clinical trials in CM and is a further example of the necessity of introducing objective markers, such as CGRP levels, in CM research to try to avoid other diagnostic mimics.

We still do not have a complete understanding of the pathophysiology of CM or the real mechanism of action of onabotA in this entity. It is well established, however, that activation of the TVS has a crucial role and leads to afferent and efferent release of neuropeptides, especially CGRP. This facilitates a peripheral inflammatory response and vasodilatory response and causes activation of second-order neurons involved in pain transmission. In most vessels, the release of neuropeptides causes endothelium- and nitric oxide-independent vasodilation through a direct action on smooth muscle cells mediated both by cyclic adenosine monophosphate and by activation of adenosine triphosphate-dependent K<sup>+</sup> channels.<sup>33,34</sup> Persistent release of CGRP and possibly other neuropeptides is thought to induce sensitization of central trigeminal neurons, and therefore migraine chronification, by triggering a signaling pathway mediated by brain-derived neurotrophic factor leading to increased expression of the P2X receptors. These peptidergic central neurons use L-glutamate as their primary neurotransmitter.<sup>35,36</sup> CGRP, acting via a unique receptor complex, increases neurotransmitter release at these levels, which could lead to the central sensitization underlying chronic pain states such as CM.<sup>7,8</sup> Our results, showing high CGRP and VIP levels in CM patients and a significant relationship between increased levels of these neuropeptides and response to onabotA, support, first, a crucial role of these neuropeptides in the pathophysiology of CM in humans, and second, that inhibition of local release of these

neuropeptides is the likely mechanism of action of onabotA in CM, as previously had been hypothesized from experimental models.<sup>37-39</sup> To fully demonstrate this possibility, it would be necessary to confirm a correlation between clinical response and a decrease in the levels of these neuropeptides, especially of CGRP, during onabotA treatment.

This study has several limitations. First, data shown here still include a limited number of CM patients and controls without headache. Second, our results in CM patients come from a selected clinical population. We do not know the true specificity of the increases in neuropeptides shown here, though at least for CGRP, it has been shown that levels in tension-type headache,<sup>40</sup> cervicogenic headache,<sup>41</sup> and in cluster headache (outside a cluster period) are below those seen in CM.<sup>9</sup> One of our potential confounders could be the fact that, due to ethical reasons, CM patients treated here with onabotA were also taking oral preventatives. However, this could make our results even more relevant as these drugs should also reduce to some degree the activation of TVS and as a consequence decrease neuropeptide release. Finally, longitudinal studies with several determinations before and after onabotA are necessary to demonstrate the consistency of our data. With these limitations in mind, our data show that interictal CGRP, and to a lesser degree VIP, levels are reliable markers first for a CM diagnosis and second for predicting response to onabotA, which confirms a crucial role of these neuropeptides in the sensitization process required for migraine chronification and suggest that the mechanism of action of onabotA in CM includes a local inhibition of the release of CGRP and other pain producing neuropeptides.

*Acknowledgments:* This study was supported by the P111/00889 FISS grant (Fondos Feder, ISCIII, Ministry of Economy, Spain). P.M.C. is supported by grant MTM2011-23204 of the Spanish Ministry of Science and Innovation.

## STATEMENT OF AUTHORSHIP

### Category 1

#### (a) Conception and Design

Julio Pascual



**(b) Acquisition of Data**

César Ramón; Davinia Larrosa; Julio Pascual; Esther Serrano-Pertierra

**(c) Analysis and Interpretation of Data**

Eva Cernuda-Morollón; Pablo Martínez-Cambor; Julio Pascual

**Category 2****(a) Drafting the Manuscript**

Julio Pascual

**(b) Revising It for Intellectual Content**

Eva Cernuda-Morollón; Pablo Martínez-Cambor; César Ramón; Davinia Larrosa; Esther Serrano-Pertierra; Julio Pascual

**Category 3****(a) Final Approval of the Completed Manuscript**

Eva Cernuda-Morollón; Pablo Martínez-Cambor; César Ramón; Davinia Larrosa; Esther Serrano-Pertierra; Julio Pascual

**REFERENCES**

- Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12:570-584.
- Zhang X, Levy D, Noseda R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: Implications for migraine with aura. *J Neurosci.* 2010;30:8807-8814.
- Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: Studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol.* 1993;33:48-56.
- Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48:438-456.
- Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol.* 1990;28:183-187.
- Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3<sup>rd</sup> edition (beta version). *Cephalalgia.* 2013;33:629-808.
- Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature.* 1996;384:560-564.
- Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;194:451-491.
- Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Cambor P, Pascual J. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology.* 2013;81:1191-1196.
- Cernuda-Morollón E, Alvarez R, Larrosa D, Ramón C, Martínez-Cambor P, Pascual J. Increased VIP levels outside migraine attacks as a marker for parasympathetic activation in chronic migraine. *Cephalalgia.* 2014; in press.
- Aurora S, Winner P, Freeman MC, et al. OnabotulinumtoxinA for the treatment of chronic migraine: Pooled analysis of the 56-week PREEMPT clinical program. *Headache.* 2011; 51:1358-1373.
- Pascual J, Díaz-Insa S, Jurado C, Guerrero A, González LCA. Migraña y migraña crónica. In: Díaz-Insa S, ed. *Guía Oficial para el Diagnóstico y Tratamiento de las Cefaleas.* Madrid: Thomson Reuters; 2011:43-76.
- Guitera V, Muñoz P, Castillo J, Pascual J. Quality of life in chronic daily headache: A study in a general population. *Neurology.* 2002;58:1062-1065.
- Bigal ME, Serrano D, Reed M, Lipton RB. Chronic migraine in the population: Burden, diagnosis, and satisfaction with treatment. *Neurology.* 2008;71:559-566.
- Bloudek LM, Stokes M, Buse DC, et al. Cost of healthcare for patients with migraine in five different countries: Results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *J Headache Pain.* 2012;13:361-378.
- Silvestrini M, Bartolini M, Coccia M, Barufaldi R, Taffi R, Provinciali L. Topiramate in the treatment of chronic migraine. *Cephalalgia.* 2003;23:820-824.
- Silberstein SD, Lipton RB, Dodick D, et al. Efficacy and safety of topiramate for the treatment of chronic migraine: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Headache.* 2007;47:170-180.
- Diener HC, Bussone G, Van Oene JC, et al. Topiramate reduces headache days in chronic migraine: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cephalalgia.* 2007;27:814-823.
- Yurekli VA, Akhan G, Kutluhan S, Uzar E, Koyuncouglu HR, Gultekin F. The effect of sodium valproate on chronic daily headache and its groups. *J Headache Pain.* 2008;9:37-41.

20. Silberstein S, Mathew N, Saper J, Jenkins S. Group for the BOTOX Migraine Clinical Research Group. *Headache*. 2000;40:445-450.
21. Farinelli I, Coloprisco G, De Filippis S, Marteletti P. Long-term benefits of botulinum toxin type A (BOTOX) in chronic daily headache: A five-year long experience. *J Headache Pain*. 2006;7:407-412.
22. Freitag FG, Diamond S, Diamond M, Urban G. Botulinum toxin type A in the treatment of chronic migraine without medication overuse. *Headache*. 2008;48:201-209.
23. Oterino A, Ramón C, Pascual J. Experience with onabotulinumtoxinA (BOTOX) in chronic refractory migraine: Focus on severe attacks. *J Headache Pain*. 2011;12:235-238.
24. Pascual J. Efficacy of BMS-927711 and other gepants vs triptans: There seem to be other players. *Cephalalgia*. 2014; March 10 (Epub ahead of print).
25. Burstein R, Jakubowski M. Unitary hypothesis for multiple triggers of the pain and strain of migraine. *J Comp Neurol*. 2005;493:9-14.
26. Goadsby PG. Autonomic nervous system control of the cerebral circulation. *Handb Clin Neurol*. 2013;117:193-201.
27. Barbanti P, Fabbri G, Pesare M, Vanacore N, Cerbo R. Unilateral cranial autonomic symptoms in migraine. *Cephalalgia*. 2002;22:256-259.
28. Avnon Y, Nitzan M, Sprecher E, Rogowski Z, Yamitsky D. Different patterns of parasympathetic activation in uni- and bilateral migraineurs. *Brain*. 2002;126:1660-1670.
29. Obermann M, Yoon MS, Dommes P, et al. Prevalence of trigeminal autonomic symptoms in migraine: A population-based study. *Cephalalgia*. 2007;27:504-509.
30. Yarnitski D, Goor-Aryeh I, Bajwa ZH, et al. Possible parasympathetic contributions to peripheral and central sensitization during migraine. *Headache*. 2003;43:704-714.
31. Schytz HW, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J, Ashina M. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain*. 2009;132:16-25.
32. Tuka B, Helyes Z, Markovics A, et al. Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia*. 2013;33:1085-1095.
33. Li J, Vause CV, Durham PL. Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxide synthesis and release from trigeminal ganglion glial cells. *Brain Res*. 2008;1196:22-32.
34. Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M, Fischer MJM. CGRP and NO in the trigeminal system: Mechanisms and role in headache generation. *Headache*. 2012;52:1411-1427.
35. Giniatullin R, Nistri A, Fabbretti E. Molecular mechanisms of sensitization of pain-transducing P2X<sub>3</sub> receptors by the migraine mediators CGRP and NGF. *Mol Neurobiol*. 2008;37:83-90.
36. Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. Origin of pain in migraine: Evidence for peripheral sensitization. *Lancet Neurol*. 2009;8:679-690.
37. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aiki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduced formalin-induced pain. *Pain*. 2004;107:125-133.
38. Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, et al. Botulinum toxin type A (15 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infra-orbital nerve constriction. *Neuroscience*. 2009;159:1422-14229.
39. Durham PL, Cady R. Insights into the mechanism of onabotulinumtoxinA in chronic migraine. *Headache*. 2011;51:1573-1577.
40. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Jansen-Olesen I, Olesen J. Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache. *Neurology*. 2000;55:1335-1340.
41. Frese A, Schilgen M, Edvinsson L, Frandsen E, Evers S. Calcitonin gene-related peptide in cervicogenic headache. *Cephalalgia*. 2005;25:700-703.





## OnabotulinumtoxinA decreases interictal CGRP plasma levels in patients with chronic migraine

Eva Cernuda-Morollón<sup>a</sup>, César Ramón<sup>a</sup>, Pablo Martínez-Cambor<sup>b,c</sup>, Esther Serrano-Pertierra<sup>a</sup>, Davinia Larrosa<sup>a</sup>, Julio Pascual<sup>a,\*</sup>

### Abstract

OnabotulinumtoxinA (onabotA) has shown efficacy in chronic migraine (CM). Its mechanism of action, however, remains obscure. We have analysed whether treatment with onabotA is able to induce changes in interictal plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentrations, which have been shown to be increased in patients with CM. Calcitonin gene-related peptide levels were determined in samples obtained from the right antecubital vein using ELISA, outside a migraine attack and having taken no symptomatic medication in the previous 24 hours, in 83 patients with CM (average age 44 years; 94% females) before and 1 month after treatment with 155 to 195 U of onabotA. CGRP levels after onabotA treatment (median, 51.89 pg/mL; range, 19.4-10.2) were significantly lower as compared with CGRP levels obtained before onabotA treatment (median, 74.09 pg/mL; range, 241.0-11.4;  $P = 0.001$ ). Pretreatment CGRP levels in responders (76.85 pg/mL) were significantly higher than those seen in nonresponders (50.45 pg/mL;  $P = 0.001$ ). One month after treatment, the CGRP levels did not change in nonresponders (51.89 pg/mL;  $P$  not significant), but significantly decreased in responders (52.48 pg/mL;  $P = 0.003$ ). A number of demographic factors, clinical features, and comorbidities were not different in responders as compared with those of nonresponders. These results confirm that interictal CGRP levels can be of help in predicting the response to onabotA and suggest that the mechanism of action of onabotA in CM is the reversal of sensitization as a result of the inhibition of CGRP release.

**Keywords:** CGRP, Chronic migraine, Migraine, OnabotulinumtoxinA

### 1. Introduction

Migraine is a common, disabling, and complex neurological disorder characterized by recurrent attacks of moderate or severe pain, aggravated by movements that are frequently unilateral, throbbing, and associated with symptoms, such as nausea and with hypersensitivity to light and sound. There are 2 types of migraine in terms of frequency: episodic migraine (fewer than 15 headache days per month) and chronic migraine (CM) (15 or more headache days per month).<sup>23</sup> Chronic migraine significantly decreases quality of life and causes morbidity in approximately 2% of the general population.<sup>8,26</sup> Treatment of CM is not easy. If analgesic overuse is present, especially because of opiates or ergotics, withdrawal is compulsory. Most patients with CM also need preventive treatment, but with the exception of topiramate,<sup>13,34</sup> there are no rigorous controlled trials for the remaining preventives used in episodic migraine. A significant proportion of patients with CM do not respond effectively to withdrawal and to any of these preventives, alone or in combination.<sup>35</sup> OnabotulinumtoxinA (onabotA) was approved in

2010 for the preventive treatment of CM based on results from PREEMPT (Phase III Research Evaluating Migraine Prophylaxis Therapy) trials in North America and Europe, which enrolled more than 1300 subjects to evaluate its efficacy and safety as headache prophylaxis in patients with CM.<sup>4,5,14</sup>

Migraine is considered a neurovascular disorder. Either a cortical spreading depression phenomenon or changes in the modulating inputs for the locus ceruleus or raphe nuclei from the brainstem are thought to activate the trigeminovascular system (TVS).<sup>1,17</sup> Activation of the TVS is thought to release vasoactive neuropeptides from presynaptic nerve terminals, mainly calcitonin gene-related peptide (CGRP) and possibly others, such as vasoactive intestinal peptide (VIP) or pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), around leptomeningeal and pericranial vessels.<sup>6,20,21</sup> The local release of these neuropeptides induces vasodilation and neurogenic inflammation, which gives rise to the typical pulsating migraine pain. It has been suggested that repeated episodes of TVS activation sensitize central pain pathways and lead to migraine chronification.<sup>31,33</sup> Supporting this concept, our group has reported that interictal peripheral plasma CGRP levels are increased in most patients showing a CM phenotype as compared with subjects without any migraine and, to a lesser degree, as compared with patients with episodic migraine.<sup>9</sup> CGRP is therefore the first biomarker to aid in a more objective diagnosis of CM. A reliable biomarker should predict the response to a specific treatment and also should change with such treatment. We have recently shown that increased CGRP levels in CM significantly correlate with clinical response to onabotA.<sup>10</sup> In this study, we have analysed whether treatment with onabotA is able to induce changes in plasma CGRP concentrations.

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

<sup>a</sup> Neuroscience Area, Service of Neurology, University Hospital Central de Asturias and Ineuropa, Oviedo, Spain, <sup>b</sup> Oficina de Investigación Biosanitaria, Oviedo, Spain, <sup>c</sup> Faculty of Education, Universidad Autónoma de Chile, Chile

\*Corresponding author. Address: Service of Neurology, University Hospital Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain. Tel.: +34985108000.; fax: +34985109407. E-mail address: julio.pascual@telefonica.net (J. Pascual).

PAIN 156 (2015) 820–824

© 2015 International Association for the Study of Pain  
<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.000000000000119>

**2. Patients and methods**

**2.1. Study participants and evaluation of efficacy**

Consecutive adults attending our headache clinic diagnosed by us as having CM according to IHS criteria and treated with onabotA were included in this study.<sup>23</sup> All patients fulfilling criteria for analgesic overuse had been detoxified at least once for a minimum of 2 months. Exclusion criteria were pregnant or breast feeding women, excessive use of alcohol, and serious, active somatic or psychiatric diseases. Patients showing the comorbidities usually seen in CM, such as anxiety, depression, or fibromyalgia or with common vascular risk factors were not excluded. A detailed medical and headache history was available for all patients, who had attended our headache clinic a minimum of once per trimester during at least 12 months before entry in this study. All patients had a general physical and neurological examination. Participants had a normal magnetic resonance imaging study within normal limits. The diagnosis and status of CM was confirmed by the use of monthly headache calendars in all patients.

Patients with CM were considered for onabotA treatment if they had failed, because of either poor efficacy and/or tolerability, treatment with at least 2 prophylactic medications with demonstrated efficacy in migraine and belonging to different pharmacological groups. Despite taking oral preventives, all patients treated with onabotA in this study continued to fulfil the CM criteria, but oral preventives were continued to look for a synergistic effect with onabotA. Without exception, we followed the PREEMPT protocol, ie, 155 to 195 onabotA units in 31 to 39 injection sites.<sup>5</sup> All patients who were treated with onabotA received onabotA at least twice over 2 consecutive periods 12 weeks apart. A patient was considered as a responder to onabotA when both endpoints were met compared with the data reflected in the diary completed in the quarter before onabotA treatment: (1) according to the diary, moderate–severe headache episodes longer than 4 hours (or shorter if treated with symptomatic medications) were reduced at least 50%; and (2) a subjective benefit according to a visual scale of 0 to 100 was also recorded by the patient as higher than 50%.<sup>34</sup> Both patients and neurologists were blinded to the results of laboratory determinations when evaluating the efficacy of onabotA.<sup>10</sup> The protocol was approved by our Ethics Committee and all patients gave informed consent.

**2.2. Laboratory procedures**

CGRP levels were determined in blood samples obtained before and 1 month (between a minimum of 3 and a maximum of 5 weeks) after treatment with onabotA in our clinic. Patients rested in a supine position, and blood samples were obtained from the right antecubital vein between 9:30 AM and noon under fasting conditions in our clinic. The blood was collected and allowed to clot, and serum was immediately separated after centrifugation for 10 minutes at 2000g. Aliquots were rapidly stored at –80°C until assayed. All samples were obtained in the absence of acute moderate–severe pain and having taken no symptomatic medication in the previous 24 hours.

Serum CGRP levels were determined using commercial ELISA kits (USCN Life Science Inc) strictly following the manufacturer’s instructions. Absorption levels were measured with a spectrophotometer from BioRad. The detection limit of the assay was <4.3 pg/mL for CGRP.

**2.3. Data analysis**

CGRP levels are described as median and range (minimum and maximum values). Age is reported using mean ± SD. Categorical

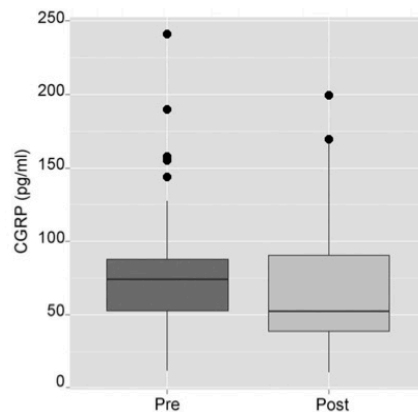
**Table 1**

**Summary of clinical characteristics of our patients with chronic migraine.**

|                              |                       | <b>N (%)</b> |            |
|------------------------------|-----------------------|--------------|------------|
| History of aura              |                       | 36 (43.37)   |            |
| Comorbidities                | Arterial hypertension | 9 (10.84)    |            |
|                              | Hypercholesterolemia  | 16 (19.28)   |            |
|                              | Depression            | 43 (51.81)   |            |
|                              | Fibromyalgia          | 10 (12.05)   |            |
|                              | Others                |              |            |
|                              | Obesity               | 4 (4.82)     |            |
|                              | Asthma                | 4 (4.82)     |            |
|                              | Epilepsy              | 1 (1.20)     |            |
|                              | Analgesic overuse     |              | 26 (31.32) |
|                              | Preventives           | Topiramate   | 37 (44.58) |
| Beta-blockers                |                       | 22 (26.51)   |            |
| Amitriptyline                |                       | 24 (28.91)   |            |
| SSRIs                        |                       | 12 (14.46)   |            |
| ACEIs                        |                       | 19 (22.89)   |            |
| Zonisamide                   |                       | 12 (14.46)   |            |
| Valproic acid                |                       | 14 (16.87)   |            |
| Polytherapy (≥2 preventives) |                       | 50 (60.24)   |            |
| Symptomatic treatment        | Triptans              | 66 (79.52)   |            |
|                              | NSAIDs                | 55 (66.26)   |            |
|                              | Ergotics              | 0 (0)        |            |
|                              | Opioids               | 8 (9.64)     |            |

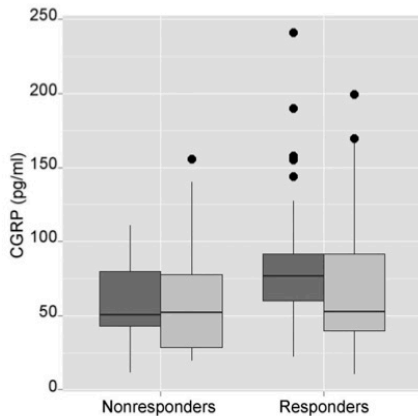
ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitors; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; SSRIs, selective serotonin reuptake inhibitors.

variables are expressed by relative and absolute frequencies. Nonparametric paired and unpaired Wilcoxon tests were used to compare the CGRP levels before vs after treatment and responders vs nonresponders, respectively. Relationships among categorical variables were tested using the exact  $\chi^2$  test. Effect sizes were measured by median difference; a 95% confidence interval (CI) based on 10,000 naive bootstrap iterations was also included. To study the robustness of the results, the effect size was computed by subgroups; the obtained results are provided in a forest plot. All computations were made by using the free available software R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). P values below 0.05 were considered significant.



**Figure 1.** Box plot for the CGRP levels in chronic migraine patients before (Pre, dark gray) and after onabotA treatment (Post, light gray).





**Figure 2.** Box plot for the CGRP levels before (dark gray) and after (light gray) onabotA treatment in nonresponder (NR) and responder (R) patients with chronic migraine.

### 3. Results

#### 3.1. Clinical data

Eighty-three patients fulfilling the CM criteria were included in this study. The mean age of the CM patients was  $44.2 \pm 12.0$  (range, 20–65); only 4 (6%) were males. By history, the average time that patients had CM was  $9.7 \pm 7.6$  years (median = 7). The main comorbidities and the treatments taken by the patients when they were enrolled in this study are shown in **Table 1**.

#### 3.2. CGRP determinations and correlation with clinical response

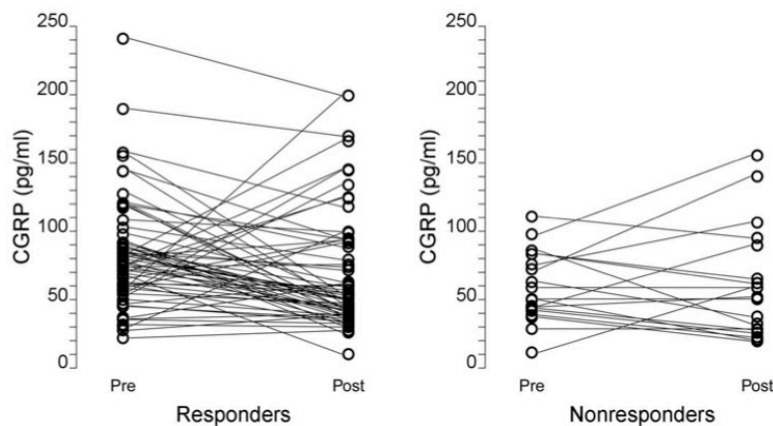
CGRP levels after onabotA treatment (median, 51.89 pg/mL; range, 19.4–101.2) were significantly lower as compared with CGRP levels obtained before onabotA treatment (median, 74.09 pg/mL; range, 24.1–111.4; the medians decrement [ $\Delta$ medians] was 22.2, 95% CI 11.05–30.54;  $P < 0.001$ ) (**Fig. 1**).

Sixty-four patients (77.1%) responded and the remaining 19 patients (22.9%) did not notice any significant response to onabotA injections. Pretreatment CGRP levels in responders (76.85 pg/mL) were significantly higher than those seen in nonresponders (50.45 pg/mL;  $P < 0.001$ ). One month after treatment, CGRP levels did not change in nonresponders (51.89 pg/mL,  $\Delta$ medians  $-1.44$ , 95% CI  $-15.15$ – $25.24$ ;  $P$  not significant), but significantly decreased in responders (52.48 pg/mL,  $\Delta$ medians 24.4, 95% CI 13.6–33.7;  $P = 0.003$ ) (**Figs. 2 and 3**). A number of demographic factors, clinical features, and comorbidities including age, duration of CM, a history of aura, acute medication overuse, depression, fibromyalgia, arterial hypertension, or obesity and treatment with triptans vs no triptan use, using preventives in monotherapy vs polytherapy or taking topiramate vs not using topiramate were not significantly, or even numerically, different in patients who responded to onabotA vs those who did not respond (**Fig. 4**).

### 4. Discussion

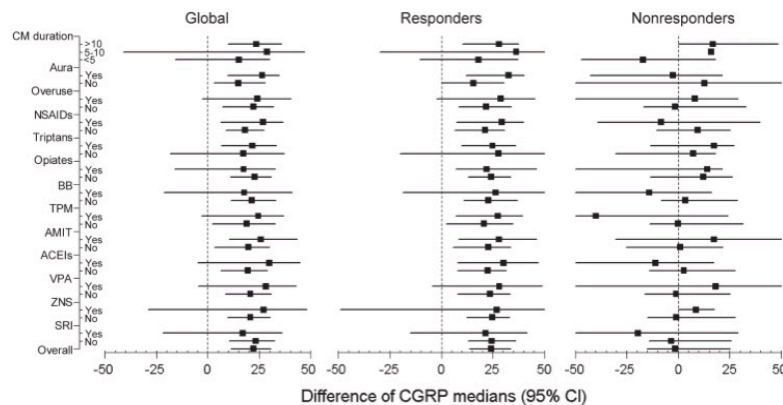
An increased CGRP level has been proposed as the first biomarker to aid in obtaining a more objective diagnosis of CM, in the context of a patient with daily or almost daily headaches and a history of migraine.<sup>9</sup> We show here that treatment with pericranial injections of onabotA significantly decreases interictal CGRP levels measured in peripheral blood samples in patients with CM.

These results contribute to clarifying the mechanism of action of onabotA in CM and suggest that the measurement of interictal CGRP levels can be of help in predicting the response to onabotA, although this finding should be confirmed in a new blinded randomized controlled trial. With the exception of imploding headaches seen in 1 study,<sup>24</sup> in the pooled analysis of the 2 big phase III trials with onabotA in CM there was no positive correlation between 85 possible clinical predictors and response to onabotA.<sup>5</sup> In a recent study, we were able to demonstrate that interictal CGRP levels seemed to be of great help in predicting the response to onabotA.<sup>10</sup> In fact, CGRP levels above 72 pg/mL allowed us a correct prediction of response to onabotA in 95% of cases, multiplying the probability of response by 28. As expected for a biomarker and its specific treatment, here we show not only that CGRP levels are decreased after onabotA treatment, but also that this reduction correlates with its efficacy rate. In fact, CGRP levels



**Figure 3.** Lines plot depicting the pretreatment and posttreatment CGRP levels in each patient. Left panel: responders; right panel: nonresponders.





**Figure 4.** Forest plot for the difference of the medians of CGRP in the patients group (global) and the subgroups (responders and nonresponders) and the demographic and clinical features registered. ACEIs, angiotensin-converting enzyme inhibitors; AMIT, amitriptyline; BB, beta-blockers; CM duration, duration of chronic migraine; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; SRI, selective serotonin uptake inhibitors; TPM, topiramate; VPA, valproic acid; ZNS, zonisamide.

decreased significantly, and very homogeneously in almost each individual as shown in **Figure 3**, only in responders to onabotA. In nonresponders, pretreatment CGRP levels were already below the CM threshold and were not reduced by onabotA treatment, which again supports a role of CGRP levels in predicting response to this treatment. Although these findings in nonresponders could be explained by limitations of this study, such as the absence of a control group, the fact that most of these patients remained on oral preventives, the relatively low numbers of nonresponders in our series, or the intrinsic and subjective variability of migraine, our results might indicate that some patients with a “CM” phenotype could suffer from other headaches (eg, psychogenic, tension-type headache or other secondary headaches) in which CGRP does not seem to be involved.<sup>3</sup> Alternatively, as shown by measuring VIP or PACAP levels in this condition,<sup>11,38</sup> in some patients with migraine, pain could be secondary to a predominant activation of the parasympathetic arm of the TVS.<sup>32,40,41</sup> This could explain the fact that the efficacy of pure CGRP antagonists “gepants” seems to be lower than that seen for triptans,<sup>28</sup> which are known to inhibit both CGRP and VIP release by the TVS.

The precise mechanism of action leading to CM prevention is not known both for oral preventives and onabotA injections, as we do not even have a good understanding of CM pathophysiology or of the exact mechanisms that lead to transformation from episodic migraine to CM. Activation of the TVS, however, is known to occur during migraine attacks, and this activation leads to afferent and efferent release of pain-producing molecules, especially of CGRP, the most ubiquitous peptide in the TVS.<sup>6,20,21,31</sup> This peripheral release of CGRP facilitates vasodilating and inflammatory responses, activates second-order neurons, and can finally induce sensitization of central pain-controlling neurons through a signalling pathway mediated by brain-derived neurotrophic factor, which results into an increased expression of a gene encoding the P2X receptors.<sup>19</sup> This central sensitization phenomenon, clinically exemplified for instance by the presence of allodynia, seems to underlie chronic pain states, such as CM.<sup>27,31,39</sup> Injections of onabotA at the designated pericranial sites would result in internalization of the neurotoxin into nearby motor neurons and disruption of the soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNARE) complex that facilitates vesicle function and

release. Although a direct muscle action could be the underlying mechanism explaining in part the analgesic effect of onabotA in other chronic painful conditions,<sup>16,22</sup> such an effect is not likely to explain headache chronification, as onabotA has been shown to be inefficacious in chronic tension-type headache,<sup>30,36</sup> a condition where interestingly CGRP levels have been shown to be normal.<sup>3</sup> In addition to motor neurons, onabotA seems to be internalized by nearby sensory neurons. Results from animal studies have provided evidence for an antinociceptive effect of onabotA mediated by repressing the local stimulated release of a number of inflammatory mediators from sensory neurons, again including CGRP.<sup>12,18,25,37</sup> When taken together, these experimental findings and our current results suggest that the primary mechanism of action of onabotA in CM is the reversal of peripheral and central sensitization as a result of the inhibition of the release of CGRP<sup>2,7,12,15</sup> and to a lesser degree also of other pain-producing molecules,<sup>11,28,40</sup> by TVS neurons. This proposal also explains the absence of efficacy of onabotA in episodic migraine,<sup>29</sup> a condition where sensitization of central neurons has not occurred.

**Conflict of interest statement**

The authors have no conflicts of interest to declare. Supported by PI11/00889 and PI14/00020 FISS grants (Plan Nacional I+D+I, Fondos Feder, ISCIII, Ministry of Economy, Spain) and by Allergan Eurasia (Institution Sponsored-Non-Interventional Study MAF/ISS/NS/CM/003). P. Martínez-Cambor is supported by grant MTM2011-23204 of the Spanish Ministry of Science and Innovation (FEDER support included).

**Article history:**

Received 20 October 2014  
 Received in revised form 23 January 2015  
 Accepted 29 January 2015  
 Available online 12 February 2015

**References**

[1] Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci* 2011;12:570–84.

- [2] Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology* 2005;26:785–93.
- [3] Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Jansen-Olesen I, Olesen J. Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache. *Neurology* 2000;55:1335–40.
- [4] Aurora SK, Dodick DW, Turkel CC, DeGryse RE, Silberstein SD, Lipton RB, Diener HC, Brin MF; PREEMPT 1 Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 1 trial. *Cephalalgia* 2010;30:793–803.
- [5] Aurora SK, Winner P, Freeman MC, Spierings EL, Heiring JO, DeGryse RE, VanDenburgh AM, Nolan ME, Turkel CC. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: pooled analyses of the 56-week PREEMPT clinical program. *Headache* 2011;51:1358–73.
- [6] Benarroch EE. CGRP: sensory peptide with multiple neurological implications. *Neurology* 2011;77:281–7.
- [7] Burnstein R, XiCgung Z, Levy D, Aoki KR, Brin MF. Selective inhibition of meningeal nociceptors by botulinum toxin A: therapeutic implications for migraine and other pains. *Cephalalgia* 2014;34:853–69.
- [8] Castillo J, Muñoz P, Guitera V, Pascual J. Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache* 1999;39:190–6.
- [9] 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;81:1191–6.
- [10] Cernuda-Morollón E, Martínez-Camblor P, Ramón C, Larrosa D, Serrano-Pertierra E, Pascual J. CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache* 2014;54:987–95.
- [11] Cernuda-Morollón E, Alvarez R, Larrosa D, Ramón C, Martínez-Camblor P, Pascual J. Increased VIP levels outside migraine attacks as a marker for parasympathetic activation in chronic migraine. *Cephalalgia* 2014; May 20. pii: 0333102414535111 [Epub ahead of print].
- [12] Cernuda-Morollón E, Ramón C, Larrosa D, Alvarez R, Riesco N, Pascual J. Long-term experience with onabotulinumtoxinA in the treatment of chronic migraine: what happens after one year? *Cephalalgia* 2014; Nov 27. pii: 0333102414561873 [Epub ahead of print].
- [13] Chesire WP, Abashian SW, Mann JD. Botulinum toxin in the treatment of myofascial pain syndrome. *PAIN* 1994;59:65–9.
- [14] Diener HC, Bussone G, Van Oene JC, Lahaye M, Schwalen S, Goadsby PJ; TOPMAT-MIG-201(TOP-CHROME) Study Group. Topiramate reduces headache days in chronic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cephalalgia* 2007;27:814–23.
- [15] Diener HC, Dodick DW, Aurora SK, Turkel CC, DeGryse RE, Lipton RB, Silberstein SD, Brin MF; PREEMPT 2 Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 2 trial. *Cephalalgia* 2010;30:804–14.
- [16] Dolly O. Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins. *Headache* 2003;43(suppl 1):S16–24.
- [17] Durham PL, Cady R. Insights into the mechanism of onabotulinumtoxinA in chronic migraine. *Headache* 2011;51:1573–7.
- [18] Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res Rev* 2005;48:438–56.
- [19] Gazerani P, Staahl C, Drewes AM, Arendt-Nielsen L. The effects of botulinum toxin type A on capsaicin-evoked pain, flare, and secondary hyperalgesia in an experimental human model of trigeminal sensitization. *PAIN* 2006;122:315–25.
- [20] Giniatullin R, Nistri A, Fabbretti E. Molecular mechanisms of sensitization of pain-transducing P2X<sub>3</sub> receptors by the migraine mediators CGRP and NGF. *Mol Neurobiol* 2008;37:83–90.
- [21] Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol* 1993;33:48–56.
- [22] Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 1990;28:183–7.
- [23] Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Peripheral and central sensitization in musculoskeletal pain disorders: an experimental approach. *Curr Rheumatol Rep* 2002;4:313–21.
- [24] Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013;33:629–808.
- [25] Jakubowski M, McAllister PJ, Bajwa ZH, Ward TN, Smith P, Burstein R. Exploding vs. imploding headache in migraine prophylaxis with Botulinum Toxin A. *PAIN* 2006;125:286–95.
- [26] Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. *J Cell Sci* 2007;120:2864–74.
- [27] Natoli JL, Manck A., Butler Q, Turkel CC, Stovner L, Lipton RB. Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia* 2010; 30:599–609.
- [28] Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitization. *Lancet Neurol* 2009;8:679–90.
- [29] Pascual J. Efficacy of BMS-927711 and other gepants vs triptans: there seem to be other players besides CGRP. *Cephalalgia* 2014;34:1028–9.
- [30] Relja M, Poole AC, Schoenen J, Pascual J, Lei X, Thompson C; European BoNTA Headache Study Group. A multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group study of multiple treatments of botulinum toxin type A (BoTNA) for the prophylaxis of episodic migraine headaches. *Cephalalgia* 2007;27:492–503.
- [31] Rollnik JD, Tanneberger O, Schubert M, Schneider U, Dengler R. Treatment of tension-type headache with botulinum toxin A: a double-blind, placebo-controlled study. *Headache* 2000;40:3000–5.
- [32] Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 1996;384:560–4.
- [33] Schytz HW, Holst H, Arendt-Nielsen L, Olesen J, Ashina M. Cutaneous nociception and neurogenic inflammation evoked by PACAP38 and VIP. *J Headache Pain* 2010;11:309–19.
- [34] Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol* 2009;194:451–91.
- [35] Silberstein SD, Lipton RB, Dodick DW, Freitag FG, Ramadan N, Mathew N, Brandes JL, Bigal M, Saper J, Ascher S, Jordan DM, Greenberg SJ, Hulihan J; Topiramate Chronic Migraine Study Group. Efficacy and safety of topiramate for the treatment of chronic migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Headache* 2007;47:170–80.
- [36] Schwedt T. Chronic migraine. *BMJ* 2014;348:g1416.
- [37] Silberstein SD, Gobél H, Jensen R, Elkind AH, Degryse R, Walcott JM, Turkel C. Botulinum toxin type A in the prophylactic treatment of chronic tension-type headache: a multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study. *Cephalalgia* 2006;26:790–800.
- [38] Tugnoli V, Capone JG, Eleopra R, Quatralo R, Sensi M, Gastaldo E, Tola MR, Geppetti P. Botulinum toxin type A reduces capsaicin-evoked pain and neurogenic vasodilatation in human skin. *PAIN* 2007; 130:76–83.
- [39] Tuka B, Helyes Z, Markovics A, Bagoly T, Szolcsányi J, Szabó N, Tóth E, Kincses ZT, Vécsei L, Tajti J. Alterations in PACAP-38-like immunoreactivity in the plasma during ictal and interictal periods of migraine patients. *Cephalalgia* 2013;33:1085–95.
- [40] Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *PAIN* 2011;152:S2–S15.
- [41] Yarnitski D, Goor-Aryeh I, Bajwa ZH, Ransil BI, Cutrer FM, Sottile A, Burstein R. 2003 Wolff Haward: possible parasympathetic contributions to peripheral and central sensitization during migraine. *Headache* 2003; 43:704–14.







## Calcitonin gene-related peptide in peripheral blood as a biomarker for migraine

César Ramón<sup>a</sup>, Eva Cernuda-Morollón<sup>a</sup>, and Julio Pascual<sup>b</sup>

### Purpose of review

There is no available biomarker for any of the primary headaches, including migraine. As demonstrated in jugular blood, during a migraine attack, trigeminal activation releases several neuropeptides, very especially calcitonin gene-related peptide (CGRP), which gives rise to the typical throbbing migraine pain. Here, we review the current evidence for measurement of peripheral CGRP levels as a potential biomarker for trigemino-vascular activation in migraine.

### Recent findings

Several studies, including a limited number of migraine patients, have shown increased peripheral CGRP levels during migraine attacks. The maximum increase in plasma CGRP levels was reached within 2 h of the onset of the attacks and can be reverted by triptans. In addition, CGRP levels measured in peripheral blood outside migraine attacks and in the absence of symptomatic medication have been shown to be increased in chronic migraine patients. Increased CGRP levels were able to predict the response to onabotulinumtoxinA treatment and were reduced 1 month after onabotulinumtoxinA therapy.

### Summary

Although CGRP data must be confirmed and expanded in future studies and specificity of CGRP levels should be studied in entities able to resemble migraine, it seems that peripheral CGRP levels are a good biomarker of acute migraine and somewhat specific and sensitive interictally in chronic migraine.

### Keywords

calcitonin gene-related peptide, chronic migraine, episodic migraine, onabotulinumtoxinA, vasoactive intestinal peptide

## INTRODUCTION

Headache is the most prevalent neurological symptom and is experienced by almost everyone. Around half of adults have experienced headache in the last year, whereas lifetime prevalence reaches three out of four people [1,2]. The burden of headache on the patients, their families and on society is considerable. As classified by the International Headache Society (IHS), primary headaches include tension-type headache, migraine, trigemino-autonomic headaches and a miscellanea of rather infrequent headaches [3]. Tension-type headache is the most frequent primary headache, but in terms of burden and consultation migraine is the most relevant headache. About 15% of adults in Europe and North America (8% of men and 17% of women) have migraine [1,2]. In terms of frequency, migraine can be divided into two types: episodic migraine (<15 headache days per month) and chronic migraine ( $\leq 15$  days per month) [3]. Estimates of worldwide prevalence of chronic migraine range from approximately 1.4 to 2.2%. Chronic migraine

is much more frequent in middle-aged women, a segment of the population where prevalence of chronic migraine can reach to 4% [4,5].

## CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN MIGRAINE PATHOPHYSIOLOGY

Migraine is considered to be a neurovascular disorder. In genetically predisposed individuals, either changes in the modulating nociceptive inputs from the raphe and locus ceruleus nuclei in the brainstem or a cortical spreading depression phenomenon are thought to activate the trigemino-vascular

<sup>a</sup>Service of Neurology, University Hospital Central de Asturias, Oviedo and <sup>b</sup>Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla and IDIVAL, Santander, Spain

Correspondence to Dr Julio Pascual, Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Av. Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain. Tel: +33942202520; e-mail: juliopascual@telefonica.net

*Curr Opin Neurol* 2017, 30:000–000

DOI:10.1097/WCO.0000000000000440

**KEY POINTS**

- CGRP plays a key role in migraine, both in acute pain generation and in promoting sensitization leading to pain chronification.
- As shown in cranial (jugular) and peripheral (antecubital) blood samples, CGRP is increased within acute migraine attacks.
- Interictal, peripheral CGRP levels are increased as compared to controls and episodic migraine in patients with chronic migraine.
- The increase in CGRP levels in chronic migraine patients is able to predict response to its specific treatment and is toned down after its successful treatment.
- These data must be confirmed in further studies, but it seems that peripheral CGRP levels are a reliable biomarker for migraine, even though this neuropeptide is not the only involved molecule.

system [6,7]. During a migraine attack, this trigeminal activation results in the release of vasoactive peptides from its presynaptic nerve terminals, very especially calcitonin gene-related peptide (CGRP), which induces vasodilatation and neurogenic inflammation in leptomeningeal and extracranial vessels giving rise to the typical pulsating migraine pain. Although the source of pain persistence in chronic migraine is unknown, it is widely accepted that pain pathways become sensitized by repeated episodes of trigeminal activation [8,9,10–12].

CGRP is a neuropeptide consisting of 37 amino acids predominantly expressed in the nervous system [13,14,15<sup>\*\*\*</sup>]. It originates from the calcitonin gene encoding calcitonin and CGRP depending upon alternative splicing. Almost half of the cell bodies of human trigeminal ganglia contain CGRP. Although many other signal molecules are located in the trigeminal ganglion, CGRP is the most abundant in human and can be seen as a marker of trigeminal activity. Human CGRP has two isoforms:  $\alpha$ -CGRP (or CGRP1) and  $\beta$ -CGRP (or CGRP2) [16,17].  $\alpha$ -CGRP is widely distributed in the central and peripheral nervous systems. Most of the cranial vasculature is innervated by  $\alpha$ -CGRP-containing C and A $\delta$  sensory nerve fibers.  $\beta$ -CGRP, which differs from  $\alpha$ -CGRP by three amino acids, is located in the enteric nerve terminals. As will be shown in this review article, CGRP is the only neurotransmitter reliably released in migraine at present. During attacks, for instance, there was a marked increase in serum CGRP levels, but no consistent changes could be observed for other neuropeptides such as

vasoactive intestinal peptide (VIP; a marker of parasympathetic activity), neuropeptide Y (sympathetic activity) and substance P (sensory activity) when their levels were analyzed in cranial venous outflow [8,9,10]. Increased CGRP levels have been also reported in saliva and cerebrospinal fluid during migraine attacks [18]. Furthermore, Lassen *et al* [19] have demonstrated that intravenous CGRP causes a delayed moderate-severe headache selective for migraine individuals. Further evidence of the involvement of CGRP in migraine is provided by data from clinical trials, as triptans block CGRP release and the CGRP antagonists olcegepant and telcegepant and more recently the monoclonal CGRP antibodies have been shown to be effective for the acute and preventive treatment of migraine, respectively [20–22].

From all these data, it is fair to conclude that CGRP seems to play an important role in migraine. As with other neurological disorders where diagnosis is based just on subjective clinical criteria, the availability of a biomarker for migraine would be welcomed. On the one hand, it would help to confirm its diagnosis. Just to put one example, a variety of entities can resemble chronic migraine phenotypically, including chronic tension-type headache, new daily persistent headache, hemicrania continua and a number of secondary headaches. On the other hand, such a migraine biomarker would help to objectively follow the response to a specific treatment both in clinical practice and in clinical trials. Jugular blood CGRP levels were suggested as a potential biomarker for acute migraine attacks more than two decades ago, but removal of cranial blood is not practical for a routine biomarker. In this article, we will revise the current evidence for measurement of peripheral CGRP levels as a potential biomarker for trigemino-vascular activation in migraine.

**CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN ACUTE MIGRAINE**

There have been only a few works and usually with a limited number of patients measuring CGRP levels in human blood. Goadsby *et al* [9] found a marked increase in plasma levels of CGRP in the external jugular vein in migraine patients with and without aura. In the same study, there was no change of CGRP in peripheral blood, though they did not compare ictal and interictal levels in migraine patients, but CGRP levels from extrajugular vein blood of migraine patients with peripheral blood and extrajugular levels of control individuals. That is, the authors did not compare ictal and interictal levels in the same patients. In a subsequent study,



Goadsby and Edvinsson [8] shown that increased CGRP levels returned to normal with the relief of headache with subcutaneous sumatriptan [10]. There was one further study which was not able to show a CGRP increase during migraine attacks in jugular venous samples [23]. In this negative study, the researchers visited patients at their home or workplace and the time between sampling and centrifugation has been considered as too prolonged, which, taking into account the rather short half-life of CGRP, would predict little neuropeptide left in the samples [24].

Because of the obvious difficulties to obtain jugular vein samples, several groups have measured CGRP levels in peripheral blood during migraine attacks. Sarchielli *et al* [25] also found an elevation of CGRP in plasma during attacks of migraine, which was reversed by rizatriptan [26]. The maximum increase in plasma CGRP levels was reached 2 h of the onset of the attacks, tended to decrease in the subsequent 2 h and was back to baseline levels within 2 h of the end of the attacks. Peripheral CGRP concentration increased during migraine attacks, provoked by sublingual nitroglycerine and returned to baseline after the cessation of migraine. The raised CGRP levels correlated to the timing of the attack and most importantly with the degree of pain. In addition, sumatriptan caused a parallel decrease in plasma CGRP and migraine headache during nitroglycerine evoked attacks [27,28]. More recently, Rodríguez-Osorio *et al.* [29] also found a very significant increase in CGRP levels in peripheral blood in a series of episodic migraine patients during attacks.

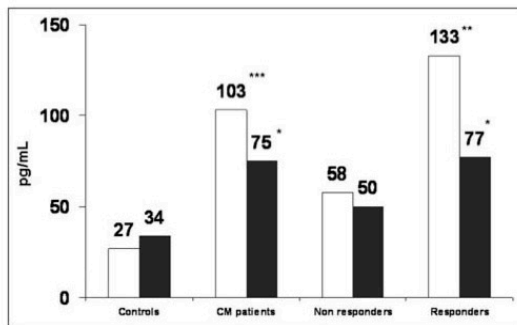
#### INTERICTAL CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN EPISODIC AND CHRONIC MIGRAINE

Apart from the already mentioned objections to obtain jugular vein samples and even though from the available data we can conclude that CGRP levels increase during the acute phase of migraine attacks, it is very difficult in clinical practice to obtain blood within a migraine attack and close to a laboratory able to process the samples immediately. Interestingly, an increase in peripheral CGRP levels in interictal, headache-free periods has been detected in migraine patients recruited in specialized headache clinics [30,31], and similar results have been reported measuring salivary levels of CGRP in migraine patients between attacks [32]. Ashina *et al.* found no difference in interictal plasma CGRP levels in patients with chronic tension-type headache and healthy control individuals, but an exploratory analysis showed that eight patients whose usual headache quality was throbbing, who

would probably be diagnosed with the new IHS criteria as chronic migraine [3], had significantly higher antecubital CGRP levels than control individuals [33]. This finding could suggest that interictal CGRP levels measured in peripheral blood could be a potential migraine biomarker, especially in chronic migraine when a rather permanent activation of the trigemino-vascular system, at least theoretically, should occur. In a recent study, our group showed that CGRP plasma levels measured in peripheral blood outside migraine attacks and in the absence of symptomatic medication were significantly increased in 103 women with chronic migraine (average +122%) as compared to healthy controls without a history of migraine [34]. Even though the CGRP levels were also significantly higher than those of healthy women in 43 episodic migraine patients (average +37%), the increase in episodic migraine was much lower. Applying receiver operating characteristic and area under the curve analysis, for a CGRP concentration of 58 pg/ml, 69% of the episodic migraine and 86% of the chronic migraine patients were correctly classified. Several clinical comorbidities, such as analgesic overuse, type of preventive treatment, history of depression, fibromyalgia or arterial hypertension, did not correlate, even numerically, with a change in CGRP levels. CGRP levels were significantly higher in women with chronic migraine having a history of migraine with aura attacks versus those who had never experienced an aura. A similar tendency had been suggested in two of the studies examining CGRP levels in migraine patients coming to specialized headache clinics. As was the case in the already mentioned work by Ashina *et al.*, the reason for these results might be that aura works as an ideal marker for a sure migraine diagnosis, which never can be so definitive in individuals with only migraine without aura attacks.

These data show that interictal concentrations of CGRP in serum from peripheral blood samples have good sensitivity and specificity for chronic migraine detection, indicating that CGRP could be the first biomarker to aid in a more objective diagnosis for chronic migraine. A reliable biomarker should predict the response to a specific treatment and also change with such treatment. In a further step, our group showed that CGRP levels in chronic migraine patients strongly correlated with their response to onabotulinumtoxinA therapy [35<sup>\*</sup>]. Chronic migraine patients with CGRP levels higher than 72 pg/ml presented a higher probability of becoming a responder than patients below this threshold. In the same patients [36<sup>\*\*</sup>], Cernuda-Morollón *et al.* have shown that onabotulinumtoxinA significantly decreases CGRP levels in peripheral





**FIGURE 1.** Average, interictal, peripheral CGRP levels taken from reference [37\*\*] (open bars) and from references [34] and [36\*\*] (closed bars). Notice (left) the significant differences found in the two works when comparing controls without headache and CM patients and (right) how CGRP levels are significantly higher in CM who responded to onabotulinumtoxinA injections versus those without response. \* $P=0.001$ ; \*\* $P=0.0004$  and \*\*\* $P=0.0001$ . CM, chronic migraine.

blood samples between attacks and measured 1 month after injection, therefore confirming interictal, peripheral levels of CGRP as a potential chronic migraine biomarker. Interestingly, CGRP levels did not change in the subset of patients who did not respond to onabotulinumtoxinA. Pre-treatment CGRP levels in these 'chronic migraine' patients were already below the chronic migraine threshold suggesting that some patients with a 'chronic migraine' phenotype could suffer from other headaches (e.g. psychogenic, tension-type headache or other secondary headaches) in which CGRP does not seem to be involved. These data have been fully confirmed recently by Dominguez-Vivero *et al* [37\*\*]. These authors show that interictal levels of CGRP in peripheral blood are increased in chronic migraine who respond to onabotulinumtoxinA treatment as compared to nonresponders. Again, plasma levels of more than 50 ng/ml are associated with a good response to onabotulinumtoxinA and classify correctly 85% of responders (Fig. 1) [37\*\*,34,36\*\*].

#### LIMITATIONS OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE AS A MIGRAINE BIOMARKER

There have been very few studies testing CGRP levels in adult patients with migraine headache and some of them with contradictory results, therefore the role of peripheral CGRP as a migraine biomarker must still be considered with caution. We do not

even know with certainty whether these increased CGRP levels are the reflection of the activation of the trigemino-vascular system, the reliability and homogeneity of the different laboratory tests to measure CGRP or what is the influence of the short half-life of CGRP on these measurements. Because of ethical reasons, most tested chronic migraine patients remained on preventives, which could also be considered a limitation on interpreting these findings. However, this could make these results even more relevant as these drugs could tone down in some degree the activation of the trigemino-vascular system and as a consequence decrease CGRP release.

Perhaps the most relevant limitation of peripheral CGRP as a true migraine biomarker would be that for 20–30% of chronic migraine patients, levels are within the range of controls without a history of headache. Forgetting the already mentioned technical questions, this fact deserves some discussion. It is possible that these patients with a theoretical chronic migraine phenotype and normal CGRP levels do suffer from other headaches mimicking chronic migraine. Alternately, in some patients with migraine, pain could be secondary to the release of other substances, such as a predominant activation of the parasympathetic arm of the trigemino-vascular system, as reflected by the interictal increase in VIP levels found in the same chronic migraine patients [38,39]. This could explain the fact that the efficacy of the selective CGRP antagonists 'gepants' seems to be lower than that seen for triptans, which are known to inhibit both CGRP and VIP release [40], and that CGRP antibodies in development seem to reduce migraine frequency by at least half in around 50% of individuals [20–22]. But even if peripheral CGRP is not elevated in a small subset of migraine patients, it is also true that, as happens for instance in Alzheimer's disease with the  $\beta$ -amyloid levels, current evidence indicates that CGRP levels could be a very useful migraine biomarker in several situations, such as a tool for reaching diagnosis in doubtful cases, for research purposes or to try to objectively measure the response to drugs in clinical trials. One further limitation to be discussed would be whether this interictal increase in CGRP is specific from migraine versus other headaches. CGRP levels have been shown increased during attacks in patients with cluster headaches [41], and our group showed that interictal CGRP levels can still be elevated, though in the range of episodic migraine [34]. CGRP levels have already been found to be similar to those of controls without headache in two important differential diagnoses for chronic migraine: chronic tension-type headache and cervicogenic headache

[33,42]. Therefore, although CGRP data must be confirmed in future studies and CGRP levels should be studied in entities such as new daily persistent headache, hemicrania continua and in several secondary headache which can mimic a chronic migraine phenotype, it seems that interictal CGRP levels are somewhat specific and sensitive in the context of patients with a daily or almost daily headache and a previous history of migraine.

## CONCLUSION

Although CGRP data must be confirmed and expanded in future studies and specificity of CGRP levels should be studied in entities able to resemble migraine, it seems that peripheral CGRP levels are a good biomarker of acute migraine and somewhat specific and sensitive interictally in chronic migraine. CGRP, however, is not increased in every migraine patient, which suggests that this neuropeptide is not the only molecule involved in migraine pain generation.

## Acknowledgements

None.

## Financial support and sponsorship

This work was supported by the P114/00020 FISSS grant (Fondos Feder, ISCIII, Ministry of Economy, Spain).

## Conflicts of interest

J.P. has served in the Advisory Board of Novartis and Allergan.

## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- ■ of outstanding interest

1. Stovner LJ, Zwart JA, Hagen K, *et al.* Epidemiology of headache in Europe. *Eur J Neurol* 2006; 13:333–345.
2. Jensen R, Stovner LJ. Epidemiology and comorbidity of headache. *Lancet Neurol* 2008; 7:345–361.
3. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS)AT The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013; 33:829–808.
4. Natoli JL, Manack A, Dean B, *et al.* Global prevalence of chronic migraine: a systematic review. *Cephalalgia* 2010; 30:599–609.
5. Castillo J, Muñoz P, Guitera V, *et al.* Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache* 1999; 39:190–196.
6. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine. Current understanding and treatment. *N Engl J Med* 2002; 346:257–270.
7. Moskowitz MA. The visceral organ brain: implications for the pathophysiology of vascular head pain. *Neurology* 1991; 41:182–186.
8. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol* 1993; 33:48–56.
9. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 1990; 28:183–187.
10. Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Res Rev* 2005; 48:438–456.
11. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 1996; 384:560–564.
12. Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 194:451–491.
13. Benarroch EE; CGRP. Sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology* 2011; 77:281–287.
14. Russo AF. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015; 55:533–552.
15. Russell FA, King R, Smillie SJ, *et al.* Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2014; 94:1099–1142.
16. Emeson RB, Hedjran F, Yeakley JM, *et al.* Alternative production of calcitonin and CGRP mRNA is regulated at the calcitonin-specific splice acceptor. *Nature* 1989; 341:76–80.
17. Tippins JR, Di Marzo V, Panico M, *et al.* Investigation of the structure/activity relationship of human calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Nucleic Acids Res Commun* 1986; 134:1306–1311.
18. Cady RK, Vause CV, Ho TW, *et al.* Elevated saliva calcitonin gene-related peptide levels during acute migraine predict therapeutic response to rizatriptan. *Headache* 2009; 49:1258–1266.
19. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, *et al.* CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 2002; 22:54–61.
20. Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, *et al.* Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* 2004; 350:1104–1110.
21. Ho TW, Mannix LK, Fan X, *et al.* Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology* 2008; 70:1304–1312.
22. Pascual J. AMG 334 CGRP antibody for migraine: time to celebrate? *Lancet Neurol* 2016; 15:347–349.
23. Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, *et al.* No increase of calcitonin gene related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol* 2005; 58:561–568.
24. Edvinsson L, Ekman R, Goadsby PJ. Measurement of vasoactive neuropeptides in biological materials: problems and pitfalls from 30 years of experience and novel future approaches. *Cephalalgia* 2010; 30:761–766.
25. Sarchielli P, Pini LA, Zanchin G, *et al.* Clinical-biochemical correlates of migraine attacks with rizatriptan responders and nonresponders. *Cephalalgia* 2006; 26:257–265.
26. Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, *et al.* Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia* 1995; 15:384–390.
27. Juhasz G, Zsombok T, Modos EA, *et al.* 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.
28. Juhasz G, Zsombok T, Jakab B, *et al.* Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack. *Cephalalgia* 2006; 25:179–183.
29. Rodriguez-Osorio X, Sobrino T, Perez-Mato M, *et al.* Endothelial progenitor cells. A new key for endothelial dysfunction in migraine. *Neurology* 2012; 79:474–479.
30. Fusayasu E, Kowa H, Takeshima T, *et al.* Increased plasma substance P and CGRP levels, and high ACE activity in migraineurs during headache-free periods. *Pain* 2007; 128:209–214.
31. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, *et al.* Evidence of increase plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain* 2000; 86:133–138.
32. Jang MU, Park JW, Kho HS, *et al.* Plasma and saliva levels of nerve growth factor and neuropeptides in chronic migraine patients. *Oral Dis* 2011; 17:187–193.
33. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, *et al.* Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache. *Neurology* 2000; 55:1335–1340.
34. Cemuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, *et al.* Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology* 2013; 81:1191–1196.
35. Cemuda-Morollón E, Martínez-Cambor P, Ramón P, *et al.* CGRP and VIP levels as predictors of efficacy of onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache* 2014; 54:987–995.
36. Cemuda-Morollón E, Ramón C, Martínez-Cambor P, *et al.* Onabotulinumtoxin A decreases interictal CGRP plasma levels in patients with chronic migraine. *Pain* 2015; 156:820–824.
37. Domínguez-Vivero C, Vieites-Prado BC, Pérez-Mato M, *et al.* CGRP and PTX3 as predictors of efficacy of onabotulinumtoxin type A in chronic migraine. *Headache*; in press.

This article demonstrates that peripheral CGRPs are able to predict response to preventive treatment in chronic migraine.

This article shows that CGRP levels are decreased after successful preventive treatment of chronic migraine, supporting a role of CGRP as a chronic migraine biomarker.

This article not only confirms CGRP as a chronic migraine biomarker, but also shows that there are other potential biomarkers, such as pentraxin 3.



## Headache

---

38. Cernuda-Morollón E, Martínez-Cambor P, Alvarez R, *et al.* 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. This work shows that VIP could also be a chronic migraine biomarker.
39. Riesco N, Cernuda-Morollón E, Martínez-Cambor P, *et al.* Relationship between serum levels of VIP, but not of CGRP, and cranial parasympathetic symptoms: a study in chronic migraine patients. *Cephalgia* 2016; Jun 1 [Epub ahead of print]
40. Pascual J. Efficacy of BMS-927711 and other gepants vs triptans: there seems to be other players besides CGRP. *Cephalgia* 2014; 34:1028–1029.
41. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache: neuropeptide changes and effects of acute attack therapies. *Brain* 1994; 117:427–434.
42. Frese A, Schilgen M, Edvinsson L, *et al.* Calcitonin gene-related peptide in cervicogenic headache. *Cephalgia* 2005; 25:700–703.

