

# AVALUACIÓ DE GENS DE SUSCEPTIBILITAT A FORMES COMUNES DE MIGRANYA

Memòria presentada per  
**Roser Corominas Castiñeira**

Per optar al grau de  
**Doctora per la Universitat de Barcelona**

Programa de Genètica  
Departament de Genètica  
Bienni 2003-2005

Tesi dirigida pel **Dr. Bru Cormand Rifà** i el **Dr. Alfons Macaya Ruiz** al Laboratori de Neurologia Infantil i Psiquiatria Genètica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona.

Dr. Bru Cormand Rifà

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Roser Corominas Castiñeira

2009

# DISCUSSIÓ





# DISCUSSIÓ

Aquest treball reflecteix l'evolució que han viscut en els darrers anys els estudis genètics de malalties complexes, concretament en el camp dels estudis d'associació de tipus cas-control.

L'avanç en el coneixement dels patrons de desequilibri de lligament del genoma humà gràcies a les dades públiques del projecte HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) ha revolucionat la forma de seleccionar marcadors en els estudis d'associació, fent possibles enfocaments basats en criteris de màxima cobertura genètica. Per altra banda, la implementació de tecnologies de genotipació massiva a preus més assequibles per a la majoria de laboratoris han incrementat el nombre i la magnitud dels estudis d'aquestes característiques. Els investigadors han constatat també la necessitat d'incrementar el número de pacients i controls per obtenir resultats creïbles. A més, l'espectacular increment del número de marcadors estudiats ha obligat a ajustar els resultats obtinguts en cada estudi mitjançant l'aplicació de correccions per múltiples comparacions, amb l'objectiu de controlar l'aparició de falsos positius (o errors de tipus I). Finalment, s'ha vist la necessitat de replicar els resultats en sèries independents de casos i controls per tal que els resultats positius siguin acceptats per la comunitat científica.

Aquest treball s'ha iniciat amb l'estudi de gens que codifiquen receptors hormonals en una sèrie reduïda d'uns 200 pacients i 200 controls. S'han estudiat mitjançant procediments de genotipació manual variacions prèviament associades a la migranya en d'altres poblacions i potencialment rellevants a nivell funcional per la seva localització exònica. Els resultats obtinguts en la nostra població no recolzen la participació d'aquests gens en la fisiopatologia de la migranya.

En segon lloc, en una mostra poblacional més àmplia de més de 500 pacients i 500 controls, s'han estudiat 19 gens relacionats amb el sistema serotoninèrgic, via que s'ha relacionat abastament amb la fisiopatologia de la migranya. S'ha estudiat un nombre elevat de marcadors per cobrir la major part de la variabilitat genètica present a la nostra mostra, i s'han detectat haplotips de risc per a MO en els gens *HTR2B* i *MAOA*, i per a MA en el gen *DDC*.

## Discussió

Per al tercer estudi que hem dut a terme, centrat en l'estudi de 9 gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic, s'ha canviat el disseny experimental i s'ha dividit la mostra en dos grups de mida similar, d'aproximadament 270 casos i 270 controls, reclutats de forma consecutiva en el temps. No obstant, els resultats obtinguts a la primera població no s'han pogut replicar a la segona població.

Finalment, amb objectiu d'explorar noves vies potencialment implicades en la migranya, s'han estudiat 15 gens que participen en la regulació de la neurosecreció sinàptica, utilitzant aquest cop tots els pacients disponibles. Actualment estem a l'espera de replicar els resultats obtinguts en una segona mostra que està essent reclutada actualment.

# 1 Característiques de la mostra recollida

Els elements més importants en els estudis genètics de qualsevol malaltia són la recollida de la mostra i el disseny de l'estudi (Cardon i Bell 2001). Una caracterització clínica rigorosa és especialment determinant en els estudis de malalties complexes. Concretament, en l'estudi de les migranyes, una de les qüestions que ha generat més controvèrsia és si la MO i la MA tenen una etiologia comuna.

En aquest apartat es discuteixen les característiques dels pacients d'aquest estudi i els mètodes de classificació, i per altra banda ens referim a la selecció de controls adequats, que també és condicionant.

## 1.1 Els pacients amb migranya

En el cas dels trastorns neurològics episòdics sense marcadors biològics determinants, la identificació de la patologia i el seu diagnòstic per part de neuròlegs especialistes es basa en dades subjectives notificades pels pacients (Loder et al. 2006). El reconeixement dels trets distintius de la migranya per part dels neuròlegs que han participat en la recollida de pacients en aquest estudi requereix una especialització en el camp de les cefalees, ja que alguns dels símptomes se solapen amb els d'altres cefalees no migranyoses que, d'altra banda, poden coexistir amb la migranya en un mateix pacient. La identificació de patrons de símptomes pre-definits, asseguren la caracterització clínica precisa i detallada dels pacients i el seu correcte diagnòstic.

De forma general, les associacions genotip-fenotip que s'han pogut replicar han utilitzat majoritàriament fenotips clarament definits i classificats a partir de criteris estandarditzats i àmpliament acceptats. La utilització de criteris acceptats redueix els errors de classificació (Chanock et al. 2007).

### 1.1.1 Logística de la recollida de casos amb migranya

La secció de Neurologia Infantil de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron va iniciar la recollida prospectiva de mostres d'àcid desoxiribonucleic (ADN) de pacients amb migranya l'any 2002, i aquesta segueix en l'actualitat. Amb l'objectiu d'incrementar el nombre de pacients pels estudis d'associació, s'ha col·laborat amb l'Hospital Sant

Joan de Déu de Manresa i amb el grup de fisiologia molecular i canalopaties de la Universitat Pompeu Fabra.

Tots els pacients procedents de la regió de Barcelona o proximitats han estat visitats per neuròlegs especialistes o entrevistats per membres de l'equip entrenats, i s'han recollit les dades corresponents als criteris ICHD-I o II en qüestionaris (IHS 1988; IHS 2004). La participació de diferents clínics en la recollida de la mostra podria fer incrementar l'heterogeneïtat del grup de pacients. Per evitar-ho, tots els qüestionaris han estat revisats per un mateix neuròleg especialista (un dels investigadors principals d'aquest del treball) i pel doctorand amb l'objectiu de confirmar que tots els pacients inclosos complien estrictament els criteris ICDH-II. D'altra banda, els pacients reclutats en el període anterior a l'establiment dels criteris ICHD-II o aquells pels quals faltava informació, van ser entrevistats telefònicament per confirmar les dades recollides a les històries clíniques. Es va parar especial atenció a descartar els individus d'origen estranger o procedents d'altres ètnies diferent a la caucàsica.

L'any 2007 es va establir una col·laboració amb un grup d'investigació de Santiago de Compostela que també realitza estudis d'associació amb migranya. En aquest grup, els criteris de recollida de casos també s'ha basat estrictament en els criteris ICHD-II.

Per evitar la presència d'heterogeneïtat clínica, la selecció dels casos s'ha centrat en la classificació ICHD-II. Malgrat això, i a causa de la manifestació episòdica de les cefalees, un mateix individu pot presentar crisis amb diferents característiques. En conseqüència, podria donar-se el cas que algun individu no compleixi tots els criteris en tots els episodis. També és freqüent que individus amb crisis d'un tipus determinat també presentin en altres moments crisis d'un altre tipus. Per exemple, la presència d'episodis de MO en individus amb MA (Kallela et al. 2001). Una repercussió a nivell pràctic és que alguns individus actualment classificats com a MO podrien presentar en el futur episodis de MA i en conseqüència canviar el seu estatus.

### **1.1.2 Característiques clíniques dels pacients de l'àrea de Barcelona**

Les dades dels qüestionaris dels 300 pacients recollits, es resumeixen a la taula 16. El 60% dels individus recollits presenten MO, mentre que el 40% restant presenten MA. L'edat d'inici de les cefalees se situa al voltant del 13 anys. El fet que molts d'aquests pacients procedeixen de les consultes de neurologia infantil podria implicar l'existència d'un biaix en aquesta dada si la comparem a l'edat d'inici mitjana de la migranya en general.

En general, les dades recollides no mostren diferències significatives entre els pacients amb MO i MA. Tan sols es pot veure una tendència entre els homes a presentar

preferentment episodis de MO respecte a MA, i una major freqüència de fonofòbia en el grup de MO. Tot i que s'han presentat en aquesta taula, les dades sobre la freqüència dels episodis i la durada no són massa fiables a causa de la variabilitat entre episodis.

**Taula 16.** Característiques clíniques dels pacients recollits a l'àrea de Barcelona

Característica clínica	MO	MA	Total	Disponibilitat dades
Nombre d'individus	178	123	301	100 %
Nombre d'homes/dones	61/117	28/95	89/212	100 %
Edat mitjana +/- de (anys)	28,9 +/- 15,0	29,8 +/- 13,4	28,6 +/- 14,4	92,7 %
Edat d'inici mitjana +/- de (anys)	13,3 +/- 7,7	12,7 +/- 5,2	13,1 +/- 6,8	96 %
Freqüència episodis +/- de (per any)	29,9 +/- 26,9	26,5 +/- 43,3	28,6 +/- 34,3	91 %
Durada mitjana episodis +/- de (hores)	33,0 +/- 24,4	30,48 +/- 33,1	32,0 +/- 28,2	83 %
Localització unilateral (%)	72,8	69,7	71,5	98 %
Dolor de característica pulsativa (%)	81,8	86,8	83,8	96,7 %
Dolor moderat o sever (%)	99,4	99,2	99,3	98 %
Agreujat per activitat física quotidiana (%)	88,0	87,8	87,9	93,4 %
Fotofòbia (%)	97,1	94,2	95,9	97,3 %
Fonofòbia (%)	98,3	90,1	94,9	97,7 %
Nàusees (%)	82,7	79,5	81,4	98 %
Vòmits (%)	65,3	60,7	63,4	98 %
Història familiar (%)	77,9	83,6	80,3	92,7 %

de: desviació estàndard

## 1.2 Consideracions sobre les formes comunes de migranya

### 1.2.1 La migranya sense aura i la migranya amb aura, mateix trastorn?

Un dels temes que ha suscitat més polèmica en el món de les migranyes és si les diferents formes de migranya tenen una etiologia comuna. Aquest debat encara és viu, però actualment, la majoria d'autors consideren més possible que MO i MA siguin simplement dues expressions clíniques del mateix trastorn més que no pas dues malalties diferents (Wessman et al. 2007; Ferrari 2008; Purdy 2008; Russell 2008).

La diferència principal entre MO i MA és l'absència o presència d'aura, mentre que la cefalea pot ser clínicament idèntica (IHS 2004). S'ha observat que la presència d'episodis de MO i MA en un mateix individu és molt habitual, més elevada del que s'esperaria per atzar (Kallela et al. 2001). També s'ha demostrat que tant la MO com la MA es poden desencadenar per les mateixes substàncies (Kallela et al. 2001). La identificació de la CSD com a fenomen responsable de l'aura està demostrat i acceptat dins la comunitat científica. No obstant, la presència d'aquest fenomen en la MO és encara motiu de debat. S'ha proposat per la MO la presència d'una aura 'silent' que comportaria el desencadenament dels mateixos mecanismes que per MA (Moskowitz



2008). A més, s'han identificat canvis en estructures precorticals i corticals implicades en la percepció sensitiva en pacients amb MO i MA identificables fins i tot entre episodis, que recolzarien la presència de CSD en MO (Granziera et al. 2006). També s'han descrit disfuncions electrofisiològiques corticals similars en individus amb MO i MA (Vincent i Hadjikhani 2007). El tractament farmacològic de la cefalea s'aplica amb èxit similar entre els dos grups.

Pel que fa els estudis genètics, les anàlisis de lligament genètic han identificat individus MO i MA en famílies amb FHM que són portadors de les mateixes mutacions que els familiars amb HM. Pel que fa els estudis d'associació, s'han identificat factors de susceptibilitat en grups barrejats de pacients amb MO i MA i altres factors específics de MO o de MA (taules 6, 7, 8, 9).

Alguns autors recolzen la hipòtesi que la MO i la MA són dues entitats clíniques diferenciades amb diferents mecanismes fisiopatològics. Expliquen la coexistència dels dos tipus de migranya en pacients per comorbiditat, es recolzen en què les característiques dels episodis de MO i MA són diferents avalant-ho per la classificació ICHD-II, i consideren que els coneixements actuals sobre la fisiopatologia són tan sols hipòtesis sense confirmar i que hi ha un nombre significatiu de treballs que apunten a mecanismes diferenciats (Manzoni i Torelli 2008).

### **1.2.2 Formes comunes de migranya i altres cefalees primàries**

Una de les hipòtesis proposades per alguns autors va més enllà d'acceptar una etiologia comuna per a la MO i la MA, i considera el conjunt de les cefalees primàries no com a entitats independents, sinó com un continuum, les dimensions del qual estarien delimitades per la severitat de la cefalea, la durada i la freqüència dels episodis, així com la presència de simptomatologia trigeminal autonòmica associada (Lane i Davies 2006). Actualment, la classificació ICHD-II inclou quatre grups ben diferenciats de cefalees primàries: (1) les migranyes, (2) les cefalees tensionals, (3) cefalea en acúmuls i altres cefalees trigeminals autonòmiques i (4) un grup d'altres cefalees primàries (IHS 2004). La proposta es basa principalment en observacions clíniques realitzades al llarg dels anys en centenars de pacients i la detecció que cap símptoma es dona de forma exclusiva en un únic tipus de cefalea primària. Una de les evidències que recolzen aquesta hipòtesi és el solapament clínic. Pacients amb MO poden experimentar fenòmens d'aura i, a l'inrevés, individus amb MA poden patir episodis de MO. Aquesta co-ocurrència recolza la idea de continuïtat. Per altra banda, alguns pacients pateixen fenòmens de transformació, és a dir, la presentació d'una cefalea com a migranya i la seva persistència en forma de cefalea tensional entre un episodi migranyós i el següent. D'altra banda, hi ha símptomes dependents de l'edat

com els dels equivalents migranyosos en període infantil que evolucionen a fenotips més típics en adults. També hi ha individus que presenten formes molt suggestives de migranya però que no compleixen estrictament els criteris de la classificació ICHD. Finalment, hi ha individus que presenten co-ocurrència de diferents cefalees primàries en un mateix període de la vida (Lane i Davies 2006). D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha suggerit que en les cefalees primàries el que està determinat genèticament és el llindar d'activació d'aquest mecanismes. Així, tots els cervells presentarien un cert nivell de vulnerabilitat i en funció del nivell d'activació es podria desenvolupar un fenotip més o menys sever.

### 1.2.3 Consideracions sobre la migranya hemiplègica

Tot i que aquest treball està centrat en l'estudi de les formes comunes de migranya, és rellevant parar atenció en la migranya hemiplègica (HM) pels coneixements que s'han adquirit sobre les seves bases genètiques, i per la influència que aquestes dades poden tenir en l'estudi de les formes comunes. La HM presenta heterogeneïtat gènica i al·lèlica i s'han identificat un gran nombre de mutacions en tres gens diferents (Estevez i Gardner 2004; Gardner 2006; Pietrobon 2007; Stam et al. 2008). D'altra banda, encara hi ha un alt percentatge de pacients en què encara no s'ha identificat una mutació responsable que tant podria estar en regions no estudiades d'aquests gens com en d'altres gens. Curiosament, algunes d'aquestes mutacions també han estat identificades en familiars de pacients amb HM que presenten altres variants de migranya o fins i tot en familiars sans (penetració incompleta) (Thomsen et al. 2007). Aquestes evidències suggereixen que altres factors, genètics o ambientals, participen en la modulació del fenotip. Aquestes mutacions podrien ser factors de susceptibilitat que contribueixen en una gran proporció al risc de presentar HM, però que necessiten altres factors de risc per determinar el grau de severitat de la migranya. Alternativament, alguns individus portadors de mutacions de susceptibilitat podrien presentar simultàniament factors de protecció que impedirien l'expressió severa del fenotip. Hi ha exemples de variacions en els gens *ATP1A2* i *CACNA1A* considerades elements moduladors del fenotip. En primer lloc s'han identificat tres mutacions en individus sense història familiar de HM al gen *ATP1A2*, però donat que aquestes no cosegreguen perfectament amb la malaltia s'ha suggerit que es tracta de factors moduladors (Todt et al. 2005). D'altra banda, estudis funcionals del canvi p.Ala454Thr en el gen *CACNA1A* en una família amb FHM cosegrega amb una forma menys severa de MA sense hemiplegia, tot suggerint que es tracta d'un factor modulador (Serra et al.). Totes aquestes dades suggereixen que els mateixos factors de susceptibilitat de MO o MA, o d'altres de diferents, podrien participar en la modulació

del fenotip HM causat per mutacions d'efecte major. Identificar aquests factors capaços de modular l'expressivitat de mutacions en gens seria de gran interès per abordar noves estratègies terapèutiques.

En canvi, alguns autors suggereixen que seria més apropiat considerar la FHM com a malaltia neurològica complexa on la migranya seria simplement un símptoma, igual que s'ha fet en d'altres trastorns genètics on la cefalea migranyosa és una característica més d'un fenotip complex, com ara l'arteriopatia cerebral autosòmica dominant amb infarts subcorticals i leucoencefalopatia (CADASIL; Lane i Davies 2006) o el MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). S'ha suggerit també agrupar la FHM, juntament amb d'altres trastorns, en una categoria independent provisional de migranyes sindròmiques (Montagna 2008a). D'acord amb aquesta proposta, la FHM no seria un bon model per a l'estudi de les formes comunes de migranya.

### **1.2.4 Altres mètodes de classificació de les migranyes**

La similitud en la prevalença de migranya entre nens i nenes en edats infantils i la posterior divergència a partir de l'adolescència (figura 3), fa imaginable que factors genètics poden influenciar de forma diferencial la població infantil i l'adult. Per investigar aquesta hipòtesi es va dividir la població de casos en dos grups segons si presentaven una edat d'inici  $\leq 10$  o  $>10$  per avaluar la participació en la migranya dels gens de receptors hormonals. Alguns autors havien aplicat aquesta estratègia anteriorment (Scher et al. 2006), mentre que d'altres s'han centrat exclusivament en pacients pediàtrics (Lisi et al. 2006; Szilagyi et al. 2006).

La revisió de la classificació ICHD-II proposa a l'apèndix noves entitats que encara no han estat suficientment validades a nivell científic per ser formalment acceptades (IHS 2004). Una d'elles és la subclassificació de la migranya sense aura (A.1.1) en tres categories: la migranya menstrual pura (A1.1.1), definida com una MO que es produeix exclusivament el dia 1+/-2 de la menstruació en un mínim de 2 de cada tres cicles mensuals i sense migranya durant la resta del cicle; la migranya relacionada amb la menstruació (A1.1.2), si es produeixen episodis de MO o MA a altres moments del cicle; i la MO no menstrual (A.1.1.3). En l'estudi centrat en gens que codifiquen receptors hormonals, igual que en les publicacions anteriors, s'han utilitzat els criteris de classificació ICHD-II acceptats. Això implicaria un augment de l'heterogeneïtat que podria explicar les discordances obtingudes entre els diferents estudis (taula 7). Seria raonable que pacients que pertanyen a diferents categories menstruals presentessin diferents factors de susceptibilitat genètica en gens de receptors hormonals. Algun mecanisme hormonal podria estar implicat principalment en dones amb migranya

menstrual pura, i s'ha proposat estudiar aquests gens en dones amb migranya relacionada amb la menstruació (MacGregor 2004). Desafortunadament, aquest paràmetre no forma part del criteris ICHD-II acceptats actualment i no està disponible per a les mostres prèviament recollides. S'han de realitzar més estudis centrats en aquest grup clínic per aclarir la influència dels receptors hormonals en la migranya menstrual. No obstant, aquesta classificació alternativa no inclouria el grup d'homes ni el de MA, que no es considera associada a la menstruació, en els quals s'hauria d'estudiar posteriorment si la variant de risc identificada també hi juga un paper.

Per ser diagnosticat seguint la classificació ICHD-II s'han de presentar, en un mínim número d'episodis, un mínim de característiques fenotípiques. D'aquesta manera és possible que individus amb diferents característiques fenotípiques s'agrupin dins la mateixa categoria clínic. És per això que alguns autors han proposat mètodes alternatius de classificació basant-se en els mateixos criteris fenotípics de la ICHD amb l'objectiu d'aconseguir grups més homogenis de mostres. Un dels mètodes consisteix en aplicar anàlisis de classes latents (LCA) per estratificar la mostra i aconseguir més homogeneïtat. De forma general, aquests tipus d'anàlisis subdivideixen els subjectes basant-se en factors demogràfics, clínics, genètics o ambientals per crear subgrups de mostres suposadament més homogènies. La premissa d'aquests mètodes és que hi ha dos o més models subjacents a la malaltia que venen condicionats pels factors amb què les dades han estat estratificades (per exemple un factor genètic associat a la malaltia tan sols en presència d'un factor ambiental, mentre que en absència del factor ambiental altres marcadors genètics participen en el fenotip). La principal limitació de l'estratificació és la reducció de la mostra i la conseqüent pèrdua de poder estadístic (Thornton-Wells et al. 2004). Alguns autors han aplicat aquesta metodologia per a l'estudi de les migranyes, especialment en cribatges genòmics per identificar *loci* lligats (Nyholt et al. 2004; Ligthart et al. 2008).

Una altra de les estratègies utilitzades en les malalties complexes són els estudis centrats en els fenotips intermediaris, coneguts com a endofenotips (Chanock et al. 2007). En el cas de la migranya aquesta estratègia s'ha utilitzat principalment en els estudis de lligament genètic (taula 5). Alguns estudis d'associació també han utilitzat aquesta estratègia sota la hipòtesi que diferents factors de susceptibilitat podrien ser responsables de les diferents característiques clíniques, però els resultats obtinguts es basen en grups reduïts i són poc conclouents. Un dels principals problemes que presenta aquesta estratègia és el fet de comparar el grup de migranyosos que presenta l'endofenotip *versus* el grup que no el presenta, que requereix mostres molt àmplies per tenir suficient poder estadístic. Un altre problema és el fet que els pacients

amb migranya poden presentar variabilitat interepisòdica respecte a un endofenotip la qual cosa dificulta la seva classificació dins d'alguna de les categories.

### **1.3 La població control**

L'objectiu dels estudis d'associació cas-control és comparar la freqüència de determinats factors de risc genètics entre individus afectats i individus control en principi no afectats per identificar associacions amb la malaltia. Per tant, la selecció dels controls apropiats és un principi epidemiològic crucial per a la validesa d'aquests estudis. Idealment, la mostra control ha de reflectir tant el component ètnic com genètic dels casos. Per assolir-ho, els controls han de ser acuradament aparellats amb els casos (Cardon i Bell 2001; Chanock et al. 2007).

Si no es duu a terme un aparellament correcte del grup de pacients i el d'individus control, qualsevol diferència en les freqüències al·lèliques o genotípiques entre ambdós, que podria semblar una associació amb la malaltia, podria ser en realitat el reflex de l'evolució o les migracions històriques, de diferències de gènere o d'altres processos independents (Cardon i Bell 2001).

En aquest treball els individus control van ser entrevistats personalment pel personal investigador o mitjançant un qüestionari detallat sobre els antecedents personals i familiar de mals de cap severos i/o recurrents. Aquells individus que presentaven història personal o familiar de migranya o d'altres cefalees van ser exclosos de l'estudi. Tots els controls van ser reclutats a les mateixes regions geogràfiques que els casos, eren d'origen caucàsic i es van aparellar per sexe amb els casos. A causa de la presència de població infantil entre els casos, i l'edat juvenil o adulta d'inici de la major part de les migranyes, els casos no s'han aparellat per edat amb els controls, per evitar la possible inclusió de controls presimptomàtics. Tot i aquestes precaucions, i a causa de l'elevada variabilitat en l'edat d'inici dels primers símptomes migranyosos, no es pot descartar que algun del individus control desenvolupi migranya en el futur, tot i que l'estratègia utilitzada ha intentat minimitzar aquesta possibilitat.

Obtenir una bona població de controls és sempre delicat per la dificultat d'obtenir mostres de persones sense la patologia estudiada que acceptin participar en l'estudi. En aquest treball els controls tenen diverses procedències: donants de sang al banc de sang de l'Hospital Vall d'Hebron, familiars no consanguinis de pacients, persones a les que es va practicar una anàlisi preoperatòria per patologia no neurològica, o persones que acudien a l'hospital a fer-se una analítica per causes diverses no relacionades amb cefalees.

Alguns autors han suggerit que una població control formada exclusivament per donants de sang no és representativa de la població on s'han recollit els casos perquè aquests individus han de superar uns criteris de selecció rigorosos i, per tant, acaben formant una població d'individus 'supersana' (Gordon i Finch 2005).

Una altra consideració important és l'aparellament a nivell de gènere entre casos i controls, com s'ha realitzat en el present treball. Aquest punt és especialment crític en malalties com la migranya en què la relació de sexes en els pacients està molt esbiaixada. Idealment les mostres haurien d'estar aparellades una a una o, quan el número de casos no és igual que el número de controls, per freqüència. Aquest requisit es basa en la hipòtesi que l'efecte d'algunes variants estudiades sobre el fenotip podria ser diferent en homes i en dones.

En alguns estudis no és possible obtenir dades fenotípiques de la mostra de controls. En aquests casos es parla de controls de població general en què la patologia en estudi no ha estat exclosa. En conseqüència, la mostra de controls presenta teòricament la mateixa freqüència de la patologia estudiada que la població general. La presència d'afectats dins del grup control dificulta la detecció de diferències entre casos i controls, i es perd poder estadístic. L'efecte de la utilització de controls de població general és dependent de la prevalença de la malaltia a la població general. En cas de trastorns poc freqüents pot arribar a ser despreciable, mentre que en trastorns molt comuns com la migranya pot condicionar l'aparició de falsos negatius.

L'alternativa dels estudis de tipus cas-control poblacionals són els estudis cas-control familiars de tipus TDT, que no han estat objecte d'aquest treball. En aquests casos s'estudia la proporció d'al·lels transmesos pels progenitors a un descendent afectat, i els al·lels no transmesos serveixen com a controls (Cardon i Bell 2001).

## 2 Consideracions generals sobre els estudis d'associació

Entre els diversos tipus d'estudis d'associació, el estudis cas-control són els més utilitzats. En aquest tipus d'abordatge es compara la freqüència de variants al·lèliques comunes entre un grup de pacients i un grup de controls amb l'objectiu d'identificar una correlació amb el fenotip. Diferències estadísticament significatives en les freqüències al·lèliques, genotípiques i/o haplotípiques indiquen la presència d'una variant que participa en el desenvolupament de la malaltia o que aquesta està en proximitat. És molt important realitzar un disseny apropiat de l'estudi per maximitzar la probabilitat d'identificar variants de susceptibilitat. En els següents apartats, es discuteixen diversos factors que poden influenciar en els estudis cas-control.

### 2.1 Determinació del fenotip en una malaltia complexa

El grup de pacients inclosos a l'estudi ha de ser homogeni per poder identificar causes genètiques comunes. Incloure diferents fenotips en un estudi, incrementant l'heterogeneïtat, pot conduir a la no detecció d'associacions quan aquestes són reals (falsos negatius o errors de tipus II). Les característiques clíniques de les migranyes s'han discutit àmpliament a la primera part de la discussió.

Tot i l'evident benefici que ha comportat per als estudis genètics la utilització de criteris estandarditzats de classificació clínica d'ús general per tota la comunitat científica, cal tenir en compte que aquests criteris no estan basats en el coneixement de les bases genètiques del trastorn, i per tant tenen unes limitacions evidents. És, doncs, plausible, que els avenços en el coneixement de les causes de la migranya obliguin en algun moment a modificar les classificacions actuals, basades únicament en dades clíniques.

### 2.2 Errors de genotipació

Els estudis cas-control poblacionals són especialment vulnerables a errors de genotipació en comparació amb els estudis basats en famílies, ja que no és factible detectar possibles errors tècnics mitjançant anàlisis de segregació (Abou-Sleiman et al. 2006). Generalment els estudis d'associació comporten la genotipació d'un gran nombre de SNPs en una gran quantitat de mostres. Errors en la classificació genotípica a petita escala o aleatoris no tendeixen a incrementar els errors de tipus I,

ja que en principi s'esdevenen de forma independent d'estatus; no obstant, tenen com a conseqüència una pèrdua de poder estadístic (Gordon i Finch 2005; Pompanon et al. 2005; Abou-Sleiman et al. 2006; Miller et al. 2008). La genotipació de casos i controls realitzada en centres diferents o per tècniques diferents podria donar lloc a errors diferencials no aleatoris, que podria tenir especial rellevància quan es procedeix per exemple a la imputació de les dades mancants (Gordon i Finch 2005).

A nivell pràctic, les contramesures habituals inclouen la inclusió de mostres duplicades intra i entre plaques, la utilització de controls negatius i la comprovació de la classificació per seqüenciació d'un grup de mostres de cada genotip (Abou-Sleiman et al. 2006). Alguns autors han suggerit que seria desitjable incloure dades confirmatòries mitjançant una segona tècnica de genotipació per verificar l'exactitud de les dades (Chanock et al. 2007).

De forma habitual, es mesura l'equilibri Hardy-Weinberg (HWE) en la mostra control per comprovar al qualitat de les dades genotípiques sota l'assumpció que una taxa d'errors elevada genera desequilibri (Pompanon et al. 2005). En aquest treball el llindar de significació per l'HWE s'ha establert a  $P=0,01$  i s'han hagut d'eliminar dos marcadors (rs1274446 del gen *HTR7* i rs609209 el gen *CPLX4*) dels estudis perquè no complien aquest criteri.

En aquest treball els marcadors s'han genotipat tant de forma manual com automatitzada. Per la confirmació dels genotips manuals s'han repetit un cert nombre de mostres i s'han inclòs individus CEPH de genotip conegut. A més, l'assignació dels diferents genotips s'ha verificat per seqüenciació directa. Pel que fa la genotipació automatitzada, s'han repetit individus en diferents plaques obtenint valors molt propers al 100% d'identitat.

Particularment interessant ha estat l'oportunitat de genotipar quatre SNPs, tres del gen *STX1A* i un del gen *SNAP25*, en aproximadament 350 individus mitjançant dues tècniques diferents: manualment per PCR-RFLP o PCR-SSCP i de forma automatitzada amb la tecnologia SNPlex. Les dades de discordança estan recollides a la taula 17, essent la mitjana de 0,36% amb una desviació estàndard de 0,28. D'aquests valors es pot concloure que la taxa d'error de genotipació en aquests estudis és mínima.

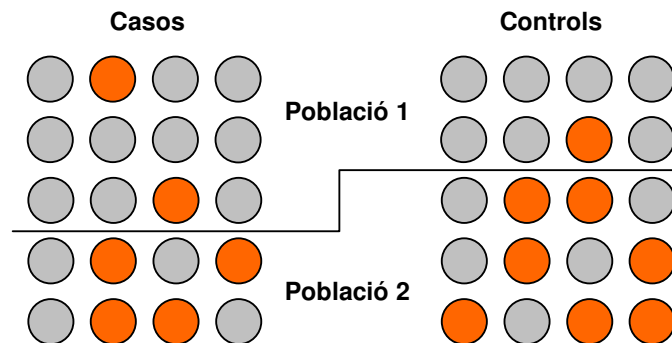


**Taula 17.** Comparació genotipació manual vs genotipació SNPlex

Gen	SNP	Genotipats Manualment	Tècnica genotipació	Genotipats SNPlex	Genotips discordants	Percentatge de discordança per marcador
STX1A	rs6951030	420	PCR-SSCP	332	2	0,60%
	rs941298	420	PCR-SSCP	348	2	0,57%
	rs4363087	420	PCR-PFLP	350	1	0,28%
SNAP25	rs4813925	420	PCR-PFLP	350	0	0%

### 2.3 Estratificació poblacional

L'estratificació poblacional es dona quan la mostra recollida està formada per una barreja d'individus de característiques diferents, en general en relació amb la seva ètnia, que poden determinar diferències en les freqüències al·lèliques no relacionades amb la malaltia estudiada. El problema sorgeix quan una de les ètnies està representada de forma desproporcionada entre casos i controls, com la població 1 de la figura 17, de manera que qualsevol polimorfisme neutre que presenti freqüències al·lèliques diferents entre les dues poblacions podria ser erròniament observat com a factor de risc (o protector) en l'estudi d'associació de casos *versus* controls, com l'al·lel gris de la figura 17. Les evidències d'associació poden ser significatives, però en realitat no estarien relacionades amb una influència real de l'al·lel investigat, sinó que són degudes a l'estructura de la població (Cardon i Bell 2001; Colhoun et al. 2003; Abou-Sleiman et al. 2006).



**Figura 17.** Esquema il·lustratiu del problema de l'estratificació poblacional. Cada cercle correspon a un al·lel, les dues variants del qual estan representades en gris o taronja. L'al·lel gris és més freqüent a la població 1, de manera que a nivell global sembla sobrerrepresentat en casos. Adaptada de (Balding 2006).

Per tant, l'existència d'ancestres genètics homogenis comuns en casos i controls és necessària, ja que l'evolució històrica dels haplotips i els patrons de LD poden variar significativament entre diferents grups ètnics i donar lloc a resultats erronis. S'ha de tenir especialment en consideració aquells casos en què la prevalença de la malaltia

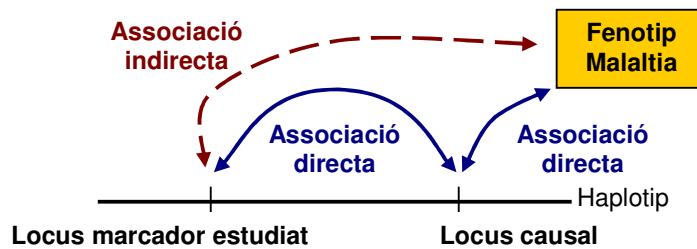
estudiada és més elevada en un grup ètnic respecte als altres, que podria resultar en una sobrerepresentació d'aquesta població entre els casos (Abou-Sleiman et al. 2006). Alguns grups ètnics que tenen un nombre limitat de fundadors poden proporcionar menys heterogeneïtat en la malaltia i regions més àmplies de LD, facilitant l'estratègia dels estudis d'associació com per exemple les poblacions de Sardenya, Finlàndia o Islàndia (Cardon i Bell 2001).

Per tal d'evitar la presència d'estratificació poblacional en aquest estudi, la mostra de casos i controls està formada exclusivament per individus d'ètnia caucàsica descendents de població espanyola. Com que els individus provenien de dues regions geogràfiques diferenciades (Catalunya i Galícia), s'ha volgut confirmar l'absència de subestructures poblacionals abans de procedir a l'anàlisi conjunt de les mostres.

Per assolir aquest objectiu s'han genotipat un grup de 48 SNPs intergènics independents localitzats a una distància mínima de 100 kb de qualsevol gen conegut (Sanchez et al. 2006). Els genotips obtinguts s'han estudiat mitjançant tres aproximacions diferents per descartar l'existència de subpoblacions. En primer lloc s'ha utilitzat el programa STRUCTURE, que utilitza genotips de múltiples *loci* per investigar l'estructura de la població (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). Sota diverses assumpcions sobre el número de subpoblacions presents a la nostra mostra de casos i controls, entre un i cinc en el nostre cas, s'ha determinat la probabilitat associada a cadascun dels models. La situació que s'ajusta millor a la nostra població és la presència d'una sola població homogènia, tot recolzant l'absència de substrats. En segon lloc s'ha calculat el coeficient *Fst* utilitzat per valorar el grau de variabilitat genètica entre poblacions i dins d'una població (Goudet 1995). Els valors calculats del coeficient *Fst* per a casos i controls estudiats conjuntament són propers a zero i indiquen que no hi ha heterogeneïtat a la mostra, recolzant per tant també la presència d'una sola població. Finalment, s'ha aplicat el mètode de Pritchard i Rosenberg per avaluar si les distribucions genotípiques per a aquests marcadors (sota models de codominància, dominància i recessivitat) eren les mateixes en casos i controls (Pritchard i Rosenberg 1999). Una vegada més, els resultats han descartat la presència d'heterogeneïtat poblacional. Aquestes anàlisis permeten concloure amb força certa que la població estudiada en aquest treball no està estratificada, de manera que és poc probable que les associacions positives obtingudes siguin producte d'un biaix ètnic (o de qualsevol altre tipus) entre casos i controls.

## 2.4 Selecció de polimorfismes i arquitectura gènica

La selecció de les variants polimòrfiques a estudiar és un punt clau en el disseny dels estudis. Els estudis d'associació es basen en la premissa que els polimorfismes analitzats estan implicats a la malaltia (associació directa) o que estan en LD amb aquesta variant rellevant a nivell funcional (associació indirecta, figura 18; Cordell i Clayton 2005).



**Figura 18.** Esquema il·lustratiu dels tipus d'estudis d'associació: associació directa i indirecta.

Abans, la majoria dels estudis d'associació tan sols contemplaven un nombre reduït de polimorfismes candidats pels quals es tenien evidències de conseqüències a nivell funcional. Però aquest tipus de polimorfisme és relativament rar, mentre que en un gen poden haver-hi multitud de variants no codificants de les quals es desconeix si tenen rellevància a nivell funcional. La tendència actual en els estudis de gens candidats és la cobertura gènica basada en patrons coneguts de LD, la qual cosa incrementa el nombre de marcadors analitzats i el cost dels estudis.

### 2.4.1 Selecció de variants polimòrfiques

Els estudis d'associació directa es basen en polimorfismes potencialment causals amb rellevància funcional prèviament establerta. Aquest tipus d'estudi és més senzill i més potent, però la identificació de polimorfismes candidats d'aquestes característiques és més complicada. Les variants situades en regions codificants dels gens que impliquen canvis d'aminoàcid són bones candidates, però n'hi ha moltes altres, com ara les variants situades en zones reguladores de la transcripció, o implicades en el tall i empalmament d'exons (*splicing*) o en d'altres modificacions post-transcripcionals (Cordell i Clayton 2005). La principal limitació és doncs el desconeixement de les possibles implicacions funcionals de la major part dels polimorfismes del genoma humà. Alguns autors han adoptat aquesta estratègia i han seleccionat un grup molt ampli de polimorfismes localitzats a regions promotores o variants exòniques per estudiar la seva participació en diferents trastorns psiquiàtrics (Gratacos et al. 2008). Com més coneixement es tingui sobre els efectes dels polimorfismes, més gran serà el nombre d'estudis d'associació directa. Actualment en migranya els estudis directes són

limitats i la tendència general és cap als estudis d'associació indirecta utilitzant criteris de màxima cobertura gènica.

La selecció de polimorfismes en els estudis d'associació indirectes es basa en els coneixements actuals sobre els patrons de LD en el genoma humà per determinar un grup de marcadors que representen la major part de la variabilitat genètica de la regió. El desequilibri de lligament existeix perquè els diversos al·lels estudiats per a cadascuna de les variacions tenen un origen ancestral comú. L'objectiu del projecte internacional HapMap és determinar les freqüències de variants polimòrfiques de tipus SNP i caracteritzar els patrons de LD al llarg del genoma humà, estudiant diverses poblacions (2003; Zondervan i Cardon 2004; 2005; Frazer et al. 2007). S'ha detectat que el genoma humà està format per blocs de grandària variable en què el LD és alt i la diversitat haplotípica limitada, i que estan separats entre ells per punts calents de recombinació (Daly et al. 2001; Zhang et al. 2002; Cardon i Abecasis 2003; Tapper et al. 2005; Gu et al. 2008).

L'objectiu comú dels diferents mètodes de selecció és limitar el nombre de polimorfismes a estudiar tot reduint les redundàncies genètiques, però minimitzant alhora la pèrdua d'informació. La majoria de polimorfismes que s'estudien són de tipus SNP (variacions d'un sol nucleòtid), per la seva elevada freqüència en el genoma, en comparació amb d'altres variacions com les VNTR (número variable de repeticions en tàndem) o les indels, entre d'altres. Els criteris de selecció es basen en la detecció de blocs haplotípics o simplement en el LD entre parelles de SNPs (Gabriel et al. 2002; Carlson et al. 2004; Gu et al. 2008). S'ha estimat que seleccionant tots els SNPs que no estan correlacionats, és a dir excloent aquells que estan a  $r^2 \geq 0.80$  respecte a un SNP representatiu (tagSNP), la densitat de SNPs es redueix entre un 75-90% sense pèrdua essencial d'informació (2005).

Per altra banda, hi ha un cert nombre de SNPs que no han estat genotipats en el projecte HapMap i que en conseqüència no es genotipen en estudis basats en cobertura gènica, fet que podria ser perjudicial en alguns estudis de malalties complexes. S'ha estimat que per aquesta causa es produeix una reducció del 20% en el poder estadístic si s'utilitzen poblacions d'origen caucàsic (Gu et al. 2008).

Per a la selecció de SNPs d'aquest treball s'han utilitzat els programes LD-select (Carlson et al. 2004) i Haploview (Barrett et al. 2005). LD-select utilitza un algoritme per a identificar grups (anomenats bins) de SNPs, a una MAF i un valor mínim de  $r^2$  establerts per l'usuari. Estudiar aquest grup reduït de tagSNPs és representatiu dels SNPs de tot el gen segons els criteris establerts. En el disseny de l'estudi s'han seleccionat tots els tagSNPs amb  $r^2 < 0.85$  en relació a tots els SNPs genotipats a la

segona fase del projecte HapMap de cada gen més 5 kb flanquejants a 5' i 3', amb MAFs superior a 0,15 o 0,25 segons el nombre de tagSNPs per gen. Això implica que marcadors amb  $MAF < 0,15$  no han estat estudiats, i en alguns gens tampoc els SNPs amb  $MAF < 0,25$ . A més, una vegada genotipats els marcadors a la nostra sèrie d'individus, s'han establert els patrons de LD dins la nostra població control i s'han eliminat de l'estudi aquells marcadors que, tot i presentar valors de  $r^2 > 0,85$  en relació a qualsevol altre marcador segons HapMap, assoleixen valors superiors a 0,85 a la nostra població. Tot i que descartar informació és sempre poc desitjable, la pèrdua és limitada en comparació amb els beneficis que s'obtenen per la simplificació de les anàlisis i l'increment del poder estadístic de l'estudi conseqüència de la reducció del nombre de comparacions (Balding 2006). Un altre inconvenient és l'eliminació de marcadors deguts a incompatibilitats en el disseny dels assaigs SNPlex. També s'han eliminat aquells SNPs amb percentatges d'individus genotipats inferior al 90 o al 85% segons l'estudi. Finalment, cal recordar que hi ha molts polimorfismes que no estan inclosos al HapMap, la nostra base de dades de referència.

Aquestes eliminacions han fet que el nivell de cobertura dels gens estudiats no sigui l'òptim en alguns casos, de manera que els resultats obtinguts no són necessàriament concloents, especialment si són negatius. Un exemple significatiu seria el cas del gen que codifica el transportador de serotonina *SLC6A4*, amb una cobertura només del 50%, o el gen que codifica el receptor de dopamina de tipus 4, *DRD4*, que no ha pogut ser estudiat. Una possible solució de cara a futurs estudis seria incloure en el disseny dels SNPs a genotipar dos SNPs per a cada bin. Però això incrementaria força el cost dels estudis i no resoliria el problema dels bins formats per un únic SNP. Segurament una solució millor seria utilitzar, un cop es disposa dels resultats de la genotipació SNPlex, tècniques alternatives per a la genotipació d'aquelles variacions que han fallat per motius diversos.

Independentment de l'estratègia adoptada per a l'estudi, en últim terme serà necessari realitzar estudis funcionals per determinar el possible paper causal d'una variant genètica, ja que la relació de causa-efecte entre gen i malaltia no es pot demostrar tan sols mitjançant els estudis d'associació (Cardon i Bell 2001).

### **2.4.2 Freqüència de la variant de susceptibilitat**

La hipòtesi de la malaltia comuna - variant comuna (*common disease-common variant*, CDCV) implica que moltes variants genètiques a la base de les malalties complexes són comunes a la població, i en conseqüència es poden identificar mitjançant estudis d'associació. L'alternativa recolzada per alguns autors és que la contribució genètica a les malalties complexes està determinada per múltiples variants de baixa freqüència

que confereixen un risc moderat (Zondervan i Cardon 2004; Balding 2006). No obstant, s'ha detectat que tan sols 3 dels 43 SNPs identificats fins ara mitjançant estudis d'associació de tot el genoma (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) que han assolit valors significatius (de l'ordre de  $10^{-8}$ ) i que s'han replicat en diverses poblacions presentaven una MAF inferior a 0,1 (Iles 2008). Això recolzaria la hipòtesi que la majoria dels al·lels associats a trastorns comuns són també comuns, tot i que podria haver-hi un biaix inherent a la dificultat estadística de detectar efectes genètics causats per variants poc freqüents, que requeriria mides mostrals molt grans (si parlem de variants d'efecte menor).

També s'ha postulat que caldria buscar l'etiologia molecular d'alguns trastorns complexes en la contribució d'un número relativament reduït de variants rares d'efecte major, i no menor com s'assumeix generalment (Bodmer i Bonilla 2008). Totes aquestes qüestions romanen encara obertes perquè no s'ha pogut dibuixar fins ara el paisatge genètic complet de cap trastorn complex.

## 2.5 Estimació d'haplotips

En els estudis d'associació poblacionals els individus no estan emparentats i, en conseqüència, no es disposa d'informació sobre la fase haplotípica dels progenitors. És per això que cal recórrer a mètodes estadístics per estimar aquestes fases. Hi ha diversos programes d'estimació d'haplotips, i en aquest treball s'han utilitzat l'UNPHASED (Dudbridge 2008) per a la identificació dels haplotips de risc per a la malaltia i el PHASE (Stephens et al. 2001) per a l'estimació dels haplotips específics de cada individu.

Estimar la fase en casos i controls simultàniament permet una millor estimació de les freqüències sota la hipòtesi de no associació, però podria introduir un biaix cap a aquesta hipòtesi, i per tant generar un major nombre d'errors de tipus II o falsos negatius. Contràriament, estimar la fase en casos i controls per separat pot portar a un increment dels errors de tipus I o falsos positius (Balding 2006). En aquest treball s'ha optat per estimar els haplotips en casos i en controls de forma separada, ja que l'estudi d'haplotips s'ha limitat a aquells gens que s'han trobat associats a nivell genotípic o al·lèlic, amb una diferent distribució entre casos i controls. És possible que els valors de OR obtinguts siguin una mica més elevats del que s'esperaria.

No hi ha descrit cap procediment estàndard per a la identificació d'haplotips de risc i molts estudis s'han limitat a estimar haplotips formats per marcadors físicament consecutius. En aquest treball s'han considerat totes les combinacions possibles de dues variants i s'ha fixat la millor parella (OR més elevat) per estudiar totes les

possibles combinacions afegint una tercera variant i així successivament. És possible que anar fixant un haplotip abans de procedir l'estudi amb més marcadors estigui impedit la detecció d'altres combinacions que podrien ser més significatives, però s'ha considerat aquesta estratègia més robusta i més adequada per evitar l'increment en el nombre de comparacions. A més, en alguns casos les limitacions computacionals impediria seguir una aproximació més oberta. Seguint aquesta estratègia és possible que l'haplotip de risc identificat no contingui els SNPs associats nominalment. Un exemple d'aquesta situació és l'haplotip de risc identificat en el gen *DDC* en el grup de MA.

## 2.6 Interaccions gen-gen i gen-ambient

De forma general, els gens no actuen de forma simplista, sinó a través de xarxes d'interacció complexes que impliquen interaccions gen-gen i gen-ambient, de tal manera que s'ha argumentat que els estudis d'associació, tal com estan plantejats en l'actualitat són simplistes i reduccionistes (Colhoun et al. 2003).

A nivell biològic, l'epistasi és l'efecte emmascarant pel qual una variant o al·lel en un locus impedeix que una altra variant d'un altre locus manifesti el seu efecte. En genètica estadística l'epistasi es refereix específicament a una desviació de l'efecte additiu de dos al·lells de diferents *loci* respecte a la seva contribució al fenotip. Essent així, el model multiplicatiu es considera un model epistàtic en què les vies implicades en la malaltia que reben la influència dels dos *loci* no són independents. Tot i que el descobriment d'efectes epistàtics pot tenir un valor limitat en el coneixement dels mecanismes biològics a la base de la patologia, acceptar diferents tipus d'interacció entre *loci* potencialment implicats en la malaltia podria augmentar les probabilitats de detectar efectes genètics (Cordell 2002). Així, considerar interaccions epistàtiques entre *loci* potencialment implicats en la migranya podria conduir a la identificació de variants genètiques altrament no detectades. Això també pot ser útil en la predicció del fenotip i per dirigir les intervencions. No obstant, la inferència de l'efecte biològic a partir dels resultats estadístics pot ser molt complicada i requereix mides mostrals molt grans. La qüestió de les interaccions biològiques es pot resoldre segurament millor mitjançant estudis moleculars (Cordell 2002).

Actualment hi ha múltiples mètodes estadístics per a detectar interaccions gen-gen que presenten avantatges i inconvenients (Musani et al. 2007). La regressió logística és una aproximació molt utilitzada per avaluar interaccions gen-gen en variables discretes (en contraposició a les contínues), i permet el modelatge directe de la relació matemàtica entre factors genètics de risc per la malaltia i altres factors de risc. També

s'han desenvolupat altres mètodes estadístics per solucionar les limitacions d'aquesta aproximació i per avaluar trets quantitius (Thornton-Wells et al. 2004).

En aquest treball s'ha utilitzat la regressió logística per comparar els nivells de significació dels models additiu i multiplicatiu i avaluar així la possible presència d'interaccions. Tan sols s'han avaluat aquests efectes quan els marcadors associats s'han identificat en el mateix grup clínic, però no s'han detectat en cap cas fenòmens epistàtics.

Un dels reptes del estudis de les malalties complexes és l'avaluació de la intervenció dels fenòmens ambientals. Possiblement, quan es tingui un coneixement més profund de les causes de les migranyes es podran dissenyar estudis per avaluar els efectes ambientals.

## 2.7 Mecanismes epigenètics

Els mecanismes genètics expliquen els estats heretables que són conseqüència de canvis en la seqüència d'ADN, mentre que els mecanismes epigenètics descriuen estats heretables que no depenen de la seqüència de l'ADN. Mecanismes epigenètics són aquells que resulten en canvis a nivell d'ADN i proteïnes reguladores de l'ADN que no modifiquen la seqüència de nucleòtids però que poden comportar el silenciament o l'activació de gens. S'han descrit quatre processos epigenètics principals: metilació d'ADN, remodelació de cromatina, ARNs no codificants i edició d'ADN i ARN (Strachan i Read 2005; Mehler 2008). Els dissenys actuals dels estudis d'associació són incapços de detectar efectes epigenètics i serà necessari el desenvolupament de noves estratègies per avaluar la participació d'aquests mecanismes a les malalties comunes.

De forma similar a altres patologies complexes, s'ha proposat que mecanismes epigenètics poden tenir un paper rellevant en la determinació del fenotip de les formes comunes de migranya (Montagna 2008a). Aquesta hipòtesi podria explicar la dificultat d'identificar gens implicats en les formes comunes de migranya.

## 2.8 Correccions per múltiples comparacions

La tendència en els estudis d'associació és augmentar el número de gens i de variants analitzats. Això implica un increment important en el número de comparacions que es realitzen, i per tant augmenta la probabilitat que algun resultat sigui estadísticament significatiu tan sols per atzar (fals positiu). Cal, per tant, establir llimars de significació més rigorosos que tinguin en compte el número de tests realitzats, però no hi ha un mètode universal per establir aquests nous límits. Una correcció inadequada per a



proves múltiples pot derivar en dos resultats igualment indesitjables: increment de falsos positius (errors de tipus I) deguts a una correcció dèbil, o no detecció d'efectes reals de les variants sobre el fenotip (errors de tipus II) deguts a l'aplicació d'una correcció massa severa. Per resoldre aquest problema s'utilitzen diferents aproximacions. La més clàssica consisteix en ajustar el valor del llindar de significació nominal, convencionalment establert a  $\alpha=0,05$ , en funció del nombre de comparacions executades (Gordon i Finch 2005; Abou-Sleiman et al. 2006; Chanock et al. 2007).

### **2.8.1 La correcció de Bonferroni per múltiples comparacions**

El mètode clàssicament més utilitzat en epidemiologia genètica és la correcció de Bonferroni per a múltiples comparacions, un mètode versàtil i simple però conservador que requereix la independència dels tests. Aquesta correcció estableix un nou llindar de significació ( $\alpha'$ ) segons el nombre de tests independents realitzats ( $n$ ) seguint la relació  $\alpha' = \alpha/n$ , amb  $\alpha$  típicament igual a 0,05. Això assegura una probabilitat d'error de tipus I no superior al 5% en cadascuna de les comparacions realitzades. El problema dels estudis d'associació és que sovint no està clar el nombre d'hipòtesis independents que es contrasten, de manera que l'aplicació estricta d'aquest mètode és extremadament conservadora i tendeix a incrementar els errors de tipus II (Curran-Everett 2000; Colhoun et al. 2003; Abou-Sleiman et al. 2006).

En aquest treball s'han estudiat diverses variants que pertanyen a un mateix gen i s'han eliminat de les anàlisis aquells SNPs que aportaven informació redundant ( $r^2 > 0,85$ ). No obstant, la resta de marcadors dins de cada gen poden presentar nivells no nuls de LD, de manera que no es tracta de marcadors totalment independents. D'altra banda, s'han realitzat anàlisis dels subgrups MO i MA de forma separada, o en alguns casos de forma conjunta, de manera que els grups fenotípics tampoc són independents. A més, les distribucions al·lèliques, genotípiques i haplotípiques també estan relacionades entre elles i per tant les diverses comparacions no són tampoc independents. En conseqüència, ajustar el nivell de significació pel mètode de Bonferroni en aquest treball és massa conservador i implica rebutjar associacions potencialment reals. Per aquesta raó també s'han aplicat altres mètodes.

### **2.8.2 Mètodes alternatius de correcció per a múltiples comparacions**

Actualment, la utilització de mètodes alternatius més apropiats va augmentant entre els investigadors. Els mètodes bayesians utilitzen la probabilitat *a priori* d'obtenir una associació per calcular la posterior probabilitat d'obtenir un fals positiu, però requereix una estimació d'una probabilitat apriorística. Una altra aproximació és la taxa de falsos descobriments (*False Discovery Rate*, FDR) que calcula la proporció de resultats

falsos positius entre tots els resultats positius obtinguts, o dit d'una altra manera, la fracció d'hipòtesis nul·les rebutjades per error. El FDR considera la distribució dels nivells de significació assolits (valors de P) com un tot i discrimina entre la distribució uniforme (hipòtesi nul·la) i aquells valors que se'n desvien (hipòtesi alternativa), ajustant el nivell de significació. Una altra solució és la utilització de correccions basades en procediments computacionals tals com el mètode de correccions per permutacions. En aquestes aproximacions, mantenint les dades genotípiques, s'assigna el fenotip de forma aleatòria entre els individus per generar grups de dades que mantenen l'estructura de desequilibri de lligament però que compleixen la hipòtesi nul·la de no associació amb el fenotip, procés que es realitza múltiples vegades. S'obtenen d'aquesta manera nous valors ajustats de significació que es comparen amb el valor  $\alpha$ . L'avantatge d'aquests mètodes és que es poden aplicar quan les comparacions són independents o quan estan relacionades. La selecció d'un tipus de correcció o un altre dependrà de cada estudi, però haurà de ser adequat al conjunt de dades (Curran-Everett 2000; Gordon i Finch 2005; Abou-Sleiman et al. 2006; Chanock et al. 2007).

En aquest treball s'ha utilitzat el FDR per a establir un llindar de significació ajustat després de les comparacions genotípiques i al·lèliques aplicades a polimorfismes individuals. El mètode de permutacions s'ha aplicat en les anàlisis d'haplotips. La utilització d'aquests mètodes ha permès identificar associacions que no es mantien significatives en aplicar les correccions de Bonferroni.

### **2.8.3 Múltiples estudis amb les mateixes mostres**

Un dels problemes que presenten els estudis d'associació i que generalment no es considera en els estudis publicats fins ara és la realització d'anàlisis successives de marcadors addicionals en un determinat grup de casos i controls. Encara que això comporti la identificació d'associacions interessants, implica que tots els resultats obtinguts es vegin afectats per la penalització per les múltiples comparacions. Aquesta és una de les limitacions que presenta aquest treball, ja que s'han estudiat en treballs separats diversos grups de gens i s'han aplicat les correccions corresponents a cada un dels grups però no a l'estudi global, que ha anat creixent al llarg del temps. Així, els resultats que s'han identificat com a positius perquè superen els llindars ajustats en cada estudi individual, podrien no ser significatius si es considera el conjunt de comparacions realitzades sumant tots els treballs que hem dut a terme.

## 2.9 Rèpliques

El propòsit de replicar els estudis d'associació és avaluar un resultat positiu obtingut en un estudi anterior en una cohort independent per confirmar que l'associació positiva identificada inicialment és vàlida. Aquesta rèplica la pot realitzar el mateix grup o un grup independent. Intentar reproduir un estudi independentment pot donar lloc a resultats contradictoris causats per l'heterogeneïtat en el disseny que podrien desembocar en la impossibilitat d'identificar l'associació, i en un biaix de publicació (Abou-Sleiman et al. 2006; Chanock et al. 2007). En conseqüència, s'han de considerar una sèrie de paràmetres en els estudis de rèpliques.

En primer lloc el disseny d'un estudi per replicar uns resultats ha de basar els càlculs de la mida de la mostra en un efecte més petit que l'efecte identificat en l'estudi inicial. Si els estudis en què es replica una associació no presenten un poder adequat per detectar un efecte dèbil, el més probable és que el resultat de l'associació no sigui significatiu a la rèplica. És possible, doncs, que moltes associacions positives siguin reals però no reproduïbles perquè l'efecte del risc és molt dèbil (Salas i Carracedo 2007).

En segon lloc, una rèplica real implica l'anàlisi dels mateixos polimorfismes i la mateixa direcció de l'efecte en una població de la mateix ètnia mesurada en el mateix fenotip que l'estudi original. S'han de distingir els treballs que estudien el mateix marcador, un marcador en LD, o SNPs addicionals genotipats per identificar noves variants associades a la malaltia a la regió (Chanock et al. 2007).

En tercer lloc, els fenotips analitzats a les rèpliques han de ser comparables a aquells que es presenten a l'estudi inicial i sense estratificació poblacional. S'ha vist que associacions significatives en diversos estudis d'una mateixa població no necessàriament són positives en altres poblacions. Els mecanismes de susceptibilitat, així com la contribució relativa d'un polimorfisme pot ser diferent entre poblacions. No replicar uns resultats en una població d'origen diferent no invalida forçosament les troballes inicials ja que només aporten informació sobre la manca d'efecte sobre la segona població (Chanock et al. 2007; Zondervan i Cardon 2007).

En molts casos, els estudis de replicació no aconseguiran reproduir els resultats inicials. Aquestes troballes són de valor i permeten distingir els falsos positius de les senyals realment positives que han de continuar essent estudiades per identificar la variant responsable. Les rèpliques són essencials per establir la credibilitat d'una associació genotip-fenotip (Chanock et al. 2007).

El tema de les rèpliques ha estat d'especial interès en aquest estudi. Els primers treballs no disposen de rèplica: estudi de gens de receptors hormonals, estudis relacionats amb el sistema serotoninèrgic i estudi del gen *STX1A*. Actualment, però, la inclusió d'una rèplica en els treballs està esdevenint un requisit necessari per tal de donar força als resultats obtinguts i perquè siguin acceptats per ser publicats. Els gens del sistema dopaminèrgic han estat estudiats seguint aquest tipus d'estratègia. De la mateixa manera, els resultats positius obtinguts per als gens relacionats amb la neurosecreció estan a l'espera de ser replicats en una segona mostra.

D'altra banda, hem observat en els nostres estudis el problema de les comparacions amb estudis anteriors centrats en els mateixos gens, ja que no sempre les variants que hem estudiat són equivalents a les estudiades per altres autors. És per això que alguns resultats negatius obtinguts per nosaltres no invaliden associacions positives anteriors. Tan sols l'estudi dels gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic és comparable a un treball publicat molt recentment en què s'ha seguit la mateixa estratègia de cobertura genètica (Todt et al. 2009). La principal diferència entre aquests estudis és que el nostre treball inclou pacients amb MO i MA, mentre que l'estudi anterior tan sols inclou pacients amb MA. La divergència en els resultats observats podria ser deguda al fet que les variants de susceptibilitat identificades siguin responsables exclusivament de la MA i que no siguin detectables a la nostra mostra a causa de la presència d'individus amb MO. Com que en el nostre estudi dels gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic s'ha seguit l'estratègia de dividir la població estudiada en dues per tenir una sèrie original i una sèrie-rèplica, no s'ha disposat de suficient poder estadístic per estudiar el grup de MA de forma aïllada.

## 2.10 Poder estadístic

Un dels passos fonamentals en el disseny i la planificació d'un estudi d'associació és el càlcul del número d'individus necessari per detectar un determinat efecte genètic sobre una malaltia concreta. El poder estadístic és la probabilitat d'obtenir en un estudi un resultat significatiu quan aquest resultat és cert a la població on s'han recollit els subjectes d'estudi (Zondervan i Cardon 2004). S'han de tenir en compte diversos factors en l'estimació del poder estadístic, alguns d'ells desconeguts en bona mesura: la magnitud de l'efecte de la variant responsable, la freqüència al·lèlica del marcador funcionalment rellevant per la malaltia i la del marcador analitzat, el LD entre aquests marcadors, la mida de la mostra i la prevalença de la malaltia (Abou-Sleiman et al. 2006).

## Discussió

Hi ha un ampli ventall de programes que permeten estimar el poder estadístic tant per a estudis d'associació com per a estudis de lligament (Knight 2004). Un dels que presenta un major nombre d'utilitats és el *Genetic Power Calculator* (Purcell et al. 2003), que té una interfase web i un arxiu de sortida (*output*) concís i útil. El programa *Power Associations With Errors* té en compte possibles errors de genotipació per tal d'adequar la mida de la mostra (Gordon et al. 2002; Gordon et al. 2003).

En general, no coneixem la magnitud de l'efecte real de les variants genètiques sobre les malalties complexes. Hom tendeix a pensar que les variants comunes contribueixen individualment en un grau molt petit sobre el fenotip. Per a polimorfismes amb freqüències al·lèliques  $>0,2$  s'estima que el risc relatiu pot estar dins del rang 1,1-1,5, mentre que per a freqüències al·lèliques entre 0,05 i 0,2 el risc relatiu podria arribar fins a  $\sim 3$ . Això sembla cert per definició, donat que una variant comuna amb un risc relatiu més alt explicaria una proporció gran de la causalitat de la malaltia, la qual cosa faria que la condició s'assemblés més a una malaltia mendeliana que a una complexa (Zondervan i Cardon 2007).

Si es fa servir una estratègia indirecta amb una selecció òptima de marcadors, els polimorfismes no causals estudiats cobreixen adequadament la variant o variants que són rellevants a nivell funcional. El poder estadístic del mètode indirecte és màxim quan la freqüència al·lèlica del marcador estudiat i la del marcador de risc és la mateixa i estan en LD total (Abou-Sleiman et al. 2006).

Mostres de mida reduïda són un problema freqüent que poden ser causa d'un poder estadístic insuficient per detectar contribucions genètiques menors. De forma similar, mostres petites poden proporcionar estimacions de la magnitud de l'efecte observat imprecises o incorrectes (Chanock et al. 2007). S'ha estimat que estudis de 500-1000 casos i controls haurien de ser generalment suficients per detectar efectes amb  $OR > 2-3$ . En canvi, per detectar marcadors amb efectes menors,  $OR \sim 1.2-1.3$ , es necessitaran estudis de  $\sim 5000$  casos i controls (Zondervan i Cardon 2004). Com a guia general, es requereixen mostres de 1000 casos i 1000 controls per detectar  $OR$  de  $\sim 1,5$  de magnitud amb un mínim poder del 80% per a marcadors amb  $MAF > 10\%$  (Cardon i Bell 2001; Abou-Sleiman et al. 2006; Zondervan i Cardon 2007).

Un factor que generalment resta poder a la detecció d'associacions en l'estudi de les malalties complexes és l'heterogeneïtat clínica de la malaltia, que pot ser el reflex de l'heterogeneïtat genètica subjacent. La divisió dels pacients en subgrups fenotípics més homogenis podria ser la solució, però en contrapartida la reducció de la mida mostral també implica una disminució del poder estadístic (Salas i Carracedo 2007).

La utilització d'una població controls en la que no s'ha descartat la patologia en estudis d'associació d'una malaltia tan prevalent com la migranya comporta una reducció important del poder estadístic. Per exemple una simulació realitzada amb el *Genetic Power Calculator* preveu una probabilitat (o poder estadístic) del 91% de detectar associació del fenotip a una variant causal amb una freqüència de 0,15, per un OR de 1,5, una prevalença de la migranya del 14%, un error  $\alpha=0,05$  i una mostra de 500 casos i 500 controls seleccionats (és a dir, controls en que s'ha exclòs la patologia en estudi). En canvi, si es mantenen tots els paràmetres però els controls no han estat seleccionats, el poder estadístic baixa fins al 80%. Per assolir un poder estadístic del 91% utilitzant controls no cribrats necessitaríem augmentar el nombre de controls fins a 1000 per comparar-los amb els 500 casos.

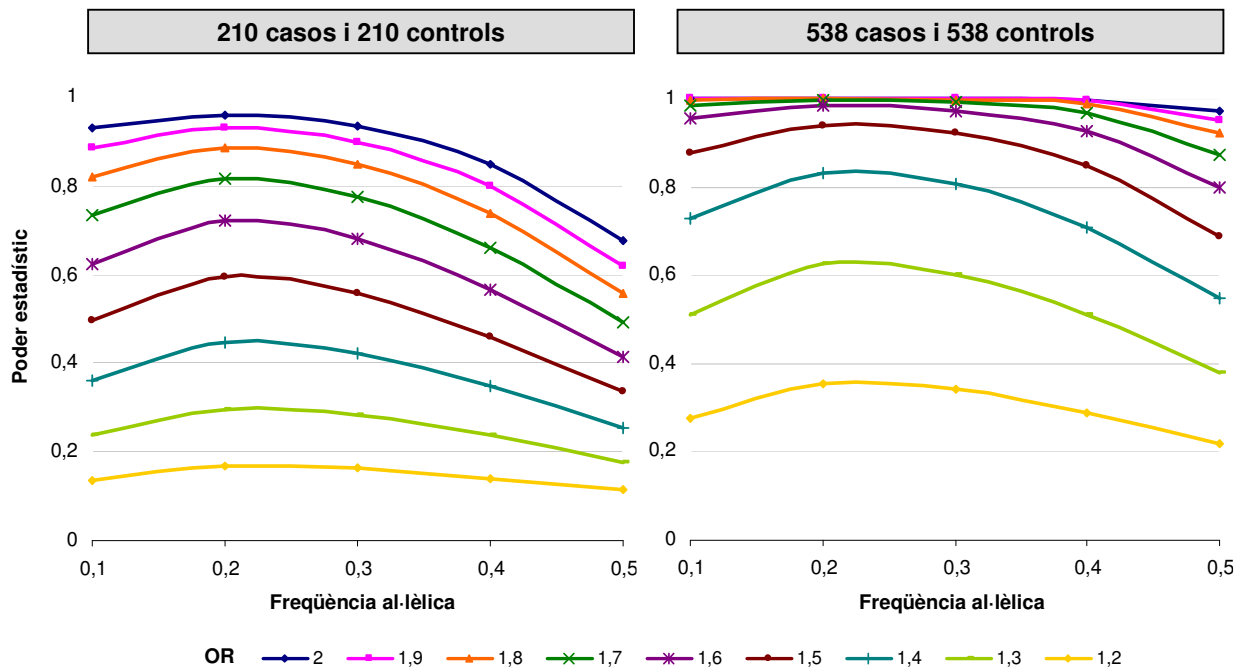
Al llarg dels diferents estudis que s'han dut a terme en aquest treball s'ha disposat de diferents mides mostrals i en conseqüència el poder estadístic ha anat variant. Com a exemple il·lustratiu d'aquesta variabilitat, s'ha realitzat una estimació del poder estadístic dels dos extrems en funció de la magnitud de l'efecte esperat (figura 19). Aquestes gràfiques ens permeten constatar el poder limitat de la nostra mostra per identificar variants d'efecte menor sobre el fenotip. No obstant, ens indiquen que el poder estadístic és superior al 80% en la mostra de 538 pacients per identificar variants amb  $OR \geq 1,5$ . Pel que fa la mostra de 210 pacients, com que les MAF dels marcadors estudiats estan entre 0,2 i 0,3 es podrien detectar amb un poder del 80%  $OR \geq 1,7$ .

Quan la recollida de casos és més costosa que la recollida de controls, es pot incrementar el poder estadístic augmentant la relació entre controls i casos (Zondervan i Cardon 2007). Aquesta estratègia és la que s'ha seguit en l'estudi del gen *STX1A*: en una primera fase s'ha identificat una associació, i en una segona fase s'ha doblat el nombre de controls; els resultats han mantingut la seva significació, tot recolzant la hipòtesi de la participació de la *STX1A* en la migranya. Tot i això, en augmentar el nombre de casos i controls l'associació no s'ha mantingut. Es tracta, per tant, de resultats en el límit de la significació estadística que caldria contrastar en estudis d'altres poblacions.

En algun dels estudis realitzats s'ha dividit el grup de migranya total en els grups clínics de MO i MA per estudiar-los per separat. Això ha comportat una pèrdua considerable de poder estadístic però, en contrapartida, ha augmentat la probabilitat de detectar factors genètics específics de subtipus clínic. Per altra banda és d'esperar que, donada la mida mostral amb que treballem actualment, els factors de

## Discussió

susceptibilitat comuns es mantinguin associats en tots dos grups quan s'estudien per separat.



**Figura 19.** Estimatció del poder estadístic en funció de la freqüència al·lèlica mínima, considerant diferents valors de OR i segons la mida mostral mínima i màxima estudiades en aquest treball. Els càlculs s'han realitzat amb el programa *Genetic Power Calculator* (Purcell et al. 2003), per a un valor  $\alpha$  (error de tipus I) de 0,05, una prevalença de la malaltia del 14%, i considerant que la variant causal està en desequilibri de lligament ( $D^2=1$ ) i presenta la mateixa freqüència al·lèlica que el marcador estudiat.

### 2.11 Diferències genètiques entre poblacions

Atès que hi ha diferències genètiques entre les poblacions humanes, ens interessa saber si els al·lèls d'un mateix gen estan associats amb la malaltia de manera diferent en diferents contextos poblacionals; dit amb altres paraules, si l'ancestralitat d'una població pot tenir influència sobre l'impacte de cada variant gènica en el risc de patir la malaltia. Si bé les freqüències al·lèliques de molts polimorfismes genètics varien significativament a les diferents poblacions, l'impacte biològic de les variants de risc per a una determinada patologia sembla ser generalment consistent entre els grups ètnics principals. No obstant això, hi ha diferències moderades en els efectes biològics que podrien explicar la falta de rèplica en un percentatge significatiu dels estudis d'associació (Salas i Carracedo 2007).

Un grup de tagSNPs seleccionats en una població per la seva bona cobertura genètica, podria ser poc representatiu de la variabilitat del gen en una altra població. No obstant, diversos estudis indiquen que sovint els tagSNPs es transfereixen bé entre

poblacions d'origen comú (Gonzalez-Neira et al. 2004; Balding 2006). Recentment s'ha publicat un estudi de 21 gens relacionats amb els sistemes serotoninèrgic i dopaminèrgic en 39 poblacions que representen la diversitat genètica global per avaluar-ne les diferències (Gardner et al. 2008). Sorprenentment, han identificat homogeneïtat de freqüències al·lèliques entre les poblacions i similitud en els patrons de LD. Conclouen que les diferències ètniques no poden explicar les discrepàncies identificades en estudis de trastorns neurològics o psiquiàtrics en diferents poblacions. Així, s'ha demostrat que la transferibilitat de tagSNPs entre poblacions és elevada.

## 2.12 Meta-anàlisis i biaix de publicacions

Les meta-anàlisis són bàsicament un resum estadístic dels resultats obtinguts en diversos estudis. Consisteixen en mètodes quantitius per combinar resultats de diferents estudis que avaluen el mateix fenotip per als mateixos marcadors, amb objectiu de mesurar i intentar explicar les inconsistències entre els diferents treballs. Aquest tipus d'estudis ofereixen l'oportunitat de combinar evidències a partir de dades acumulades en estudis retrospectius o generades en estudis prospectius. Proporcionen una estimació a mode de resum que pot ajudar a detectar inconsistències potencials entre grups combinats de dades (Kavvoura i Ioannidis 2008).

Es poden utilitzar diferents mètodes estadístics per realitzar aquests estudis. Però s'ha de ser meticulós en la selecció dels treballs inclosos, ja que la fiabilitat de l'estudi dependrà de la qualitat i comparabilitat d'aquestes dades. Alguns autors han proposat crear xarxes de col·laboració per a la generació de dades per realitzar meta-anàlisis, per la seva utilitat en l'estudi les bases genètiques de les malalties complexes quan s'apliquen i s'interpreten de forma apropiada (Kavvoura i Ioannidis 2008).

Un dels principals problemes de les meta-anàlisis és el biaix de publicacions. La literatura tendeix a reflectir tan sols estudis d'associació positiva, mentre que un percentatge elevat dels estudis negatius no es publiquen. Per tant, hom espera trobar-se amb una tendència sistemàtica cap a valors significatius de  $P$ , més sovint del que s'esperaria trobar únicament per atzar (Salas i Carracedo 2007). La preferència per publicar resultats positius, encara que provinguin de dissenys no òptims, presenta una barrera per a la difusió dels estudis ben dissenyats però amb resultats negatius. Els estudis negatius són difícils de publicar però són crucials per distingir les associacions positives reals de les falsament positives (Chanock et al. 2007). En conseqüència, qualsevol revisió sistemàtica de les publicacions podrà ésser errònia (Colhoun et al. 2003).



## Discussió

Alguns autors han suggerit sistemes alternatius per difondre els resultats d'estudis d'associació negatius a causa dels problemes de difusió derivats de la manca d'interès per part de certes revistes. S'ha proposat crear un sistema web en què el propis autors entrin les dades dels seus estudis. Les dades es classificarien per polimorfismes i fenotips i de forma automatitzada s'inclourien en una meta-anàlisi (Colhoun et al. 2003).

## 3 Consideracions particulars sobre els resultats obtinguts

### 3.1 Estudi de gens de receptors hormonals

La participació en la migranya de gens que codifiquen receptors d'hormones ha estat objecte de molts estudis durant els darrers anys (taula 7). En aquest treball, la selecció de marcadors es va centrar en tres SNPs sinònims del gen *ESR1* i una inserció *Alu* del gen *PGR* però no es van poder reproduir les associacions prèviament identificades.

Aquest és l'únic estudi d'aquest treball en què l'estratègia utilitzada per a la selecció de polimorfismes no ha estat la cobertura gènica, sinó la selecció de variants exòniques potencialment rellevants a nivell funcional tot i ser sinònimes. S'han descrit diversos mecanismes pels quals canvis sinònims afecten la funcionalitat de la proteïna. En primer lloc, s'han descrit algunes malalties genètiques causades per mutacions silencioses en dominis d'unió d'elements reguladors del *splicing* del tipus *exonic splicing enhancers* (ESE) o *silencers* (ESS). Aquests elements participen en el tall i unió d'exons, de manera que algunes variants polimòrfiques que hi estan localitzades poden provocar la no incorporació d'exons a la molècula de ARNm, alteracions en l'eficiència de tall i unió i fins i tot canvis en els nivells d'expressió de la proteïna (Blencowe 2000; Black 2003; Wang i Cooper 2007). En segon lloc, canvis sinònims poden interferir en la unió de microRNAs al ARNm provocant canvis en la producció de proteïna (Parmley i Hurst 2007; Bartel 2009). Finalment hi ha dos nous mecanismes que tan sols s'han documentat en una ocasió cada un d'ells: un haplotip format per 3 polimorfismes silencis que afecta l'estabilitat dels nivells d'ARNm i en conseqüència la concentració de proteïna i l'activitat enzimàtica; i canvis sinònims que aparentment comprometen el plegament de la proteïna, possiblement a causa d'un alentiment de la traducció pel reclutament de ARNts rars, que altera l'activitat proteica (Kimchi-Sarfaty et al. 2007; Komar 2007; Parmley i Hurst 2007).

Els resultats obtinguts de l'estudi dels gens dels receptors hormonals no recolzen la participació dels polimorfismes estudiats en la migranya. Aquestes dades es contradiuen aparentment amb els resultats obtinguts en una població espanyola per al polimorfisme rs1801132 situat a l'exó 4 (Oterino et al. 2006; Oterino et al. 2008). És poc probable que factors genètics estiguin influint de forma diferencial sobre la patologia en dues poblacions espanyoles. En conseqüència, l'obtenció de resultats

contradictoris entre els treballs de Oterino i col·laboradors i el nostre impliquen que les conclusions d'algun d'aquests són errònies. El fet que identifiquin associació específicament en el grup de MA i amb una OR de 1,6, suggereix que el nostre treball no té prou poder estadístic per detectar variants de tan baix risc en el subgrup de MA i per tant es podria tractar d'un error de tipus II. La participació d'aquesta variant en MA coincideix amb l'associació nominal identificada per Kaunisto i col·laboradors en població finlandesa (Kaunisto et al. 2006). Curiosament, en població australiana s'havia identificat una variant de risc diferent a l'exó 8, el rs2228480, que no està en LD amb el SNP de l'exó 4, però per la variant de l'exó 4 no es van trobar evidències d'associació (Colson et al. 2004; Colson et al. 2005; Colson et al. 2006). Calen estudis amb sèries molt més grans de pacients per assolir suficient poder estadístic per detectar efectes de baixa intensitat i aclarir la participació d'aquestes variants en les migranyes. També seria interessant realitzar estudis de meta-anàlisis per les variants sinònimes estudiades repetidament en diverses poblacions del mateix origen ètnic.

Per altra banda, seria molt interessant estudiar la participació de gens relacionats amb sistemes d'hormones sexuals en les noves categories proposades de migranya pura menstrual i/o migranya relacionada amb la menstruació. És raonable pensar que les formes de migranya relacionades exclusivament, o majoritàriament, amb la menstruació siguin més susceptibles a variants de risc presents en gens de receptors hormonals. Això podria explicar en part les diferències entre els resultats obtinguts per Oterino i col·laboradors i els nostres, donada l'abundància de casos infantils, en edat pre-menstrual i amb diferent proporció de gènere, en la nostra mostra inicial de 200 pacients. De la mateixa manera seria interessant aplicar la divisió per edat d'inici en mostres més grans, sota la hipòtesi que els factors genètics puguin influenciar de forma diferencial la població infantil i l'adult.

### **3.2 Estudi de gens relacionats amb el sistema serotoninèrgic**

Hi ha diverses evidències que recolzen la participació del sistema de neurotransmissió serotoninèrgica en la migranya. Però els estudi d'associació realitzats fins ara s'han centrat principalment en un nombre limitat de variants genètiques i de pacients. En aquest treball s'han estudiat 101 SNPs de 19 gens en una mostra de 528 casos i 528 controls. S'han identificat associacions nominals en múltiples gens i haplotips que confereixen susceptibilitat a MO en els gens *HTR2B* (rs16827801T-rs10194776G) i *MAOA* (rs3027400G-rs2072743C), i un haplotip de risc a MA en el gen *DDC* (rs2329340A-rs11974297C-rs2044859T-rs11761683G).

El receptor de serotonina 5HT2B s'expressa en diversos teixits, entre ells el teixit miocardiàc i els endotelis vasculars (Manivet et al. 2000). Els receptors 5HT2B localitzats a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis de les meninges podrien contribuir a desencadenar la migranya via la formació d'òxid nítric (NO), que pot induir l'alliberament de neuropèptids proinflamatoris d'aferents sensorials trigeminals, donant com a resultat inflamació neurogènica i extravasació de proteïnes plasmàtiques (Manivet et al. 2000; Johnson et al. 2003a). S'ha demostrat que l'estimulació dels receptors 5HT2B relaxa l'artèria cerebral en porcs mitjançant l'alliberament de NO (Schmuck et al. 1996). Però la utilització d'antagonistes d'aquest receptor en pacients amb migranya està contraindicada a causa del risc de provocar vasoconstricció coronària. Hi ha antagonistes específics de receptors 5HT2B que han demostrat ser eficaços bloquejant l'extravasació de plasma (Johnson et al. 2003a). A més, el fàrmac antimigranyós dihidroergotamina (DHE) i el seu principal metabòlit 8'-hidroxi-DHE (8'-OH-DHE) s'uneixen, entre d'altres, als receptor 5HT2B i actuen de forma agonista (Schaerlinger et al. 2003). L'acció antimigranyosa de la DHE podria ser, en part, resultat del seu efecte en la inhibició de la inflamació neurogènica i en part de la seva acció inhibidora de la vasodilatació (Panconesi i Sicuteri 1997). S'ha demostrat que la 8'-OH-DHE pot induir una desensibilització persistent dels receptors 5HT2B per la inhibició de producció de NO, la qual cosa contribuiria a la seva eficàcia terapèutica (Schaerlinger et al. 2003). S'espera que altres estudis del bloqueig dels receptors 5HT2B en la profilaxis de la migranya corroborin la presumible hipersensibilitat d'aquests receptors en la iniciació de la resposta d'inflamació neurogènica (Schmuck et al. 1996). Aquest és el primer estudi d'associació que avalua la participació d'aquest gen en migranya, i d'acord amb aquests mecanismes, és raonable pensar que variants en aquest gen participin en la susceptibilitat a la migranya.

La importància de la MAOA en la migranya ve determinada per la seva funció en la degradació de diverses amines biològiques com la serotonina i la dopamina. En conseqüència, aquest enzim és un bon candidat d'ambdós sistemes. D'altra banda, s'ha suggerit que una reducció de l'activitat monoaminèrgica quadraria amb la hiperactivitat observada en el tronc de l'encèfal (Marziniak et al. 2004). La participació d'aquest gen en la migranya ja havia estat objecte d'estudis anteriors centrats principalment en una variant de tipus VNTR localitzada a la regió promotora (taula 8). La manca de coneixements sobre els patrons de LD entre aquesta variant i els SNPs del nostre estudi ens impedeixen fer una comparació adequada.

En comparar les distribucions dels haplotips de risc d'aquests dos gens (*HTR2B* i *MAOA*) per separat en pacients amb MA *versus* controls no es van obtenir resultats significatius. Tampoc es van detectar diferències en comparar les freqüències entre

## Discussió

MO i MA. Aquesta dada és especialment interessant ja que suggereix que aquests haplotips també podrien estar conferint risc al grup de MA, però que potser no hem pogut detectar aquest efecte. Es necessiten estudis més amplis per confirmar o descartar la participació d'aquests haplotips en la MA.

L'enzim AADC participa en la síntesi de 5HT i de DA. En l'estudi del gen *DDC*, les associacions individuals nominals i l'haplotip de risc que s'han identificat confereixen susceptibilitat exclusivament al grup de MA. Tan sols un estudi previ havia estudiat un polimorfisme de tipus inserció/deleció en aquest gen (taula 8) i no va identificar associació (Johnson i Griffiths 2005). A causa del desconeixement dels patrons de LD entre aquesta variant i els SNPs d'aquest estudi no es poden comparar els resultats obtinguts. En canvi, molt recentment, en un treball centrat en la participació de gens del sistema dopaminèrgic en MA en població alemanya, Todt i col·laboradors han realitzat un estudi més exhaustiu d'aquest gen sense identificar variants de susceptibilitat (Todt et al. 2009). Aquest treball és molt similar al nostre en nombre d'individus amb MA i per tant, molt interessant per comparar els resultats obtinguts. En aquesta ocasió els SNPs estudiats per Todt i col·laboradors es van seleccionar a partir de la base de dades del projecte HapMap, de manera que els SNPs són comparables amb els del nostre estudi tot i no ser exactament els mateixos (taula 18). Dels 10 marcadors que estudien, cinc estan en LD amb SNPs del nostre estudi ( $r^2 > 0,85$ ), quatre no van entrar al nostre estudi perquè presentaven  $MAF < 0,25$ , i un cinquè SNP es va descartar per restriccions en el disseny de SNPlex. Per altra banda, en el nostre estudi es van incloure 7 marcadors més per assolir una millor cobertura gènica. En les dues poblacions les freqüències en població control dels SNPs comparables són molt similars, però els resultats obtinguts en l'estudi d'associació a nivell de SNPs individuals no són significatius. Les variacions associades nominalment al fenotip a la nostra població no han estat estudiades per Todt i col·laboradors, que pel fet de no identificar cap associació nominal en aquest gen no van prosseguir l'estudi en una segona població ni van realitzar les anàlisis d'haplotips. En conclusió, podem dir que els resultats no es contradueixen necessàriament i que el nostre treball presenta una millor cobertura genètica.

Realitzar estudis funcionals dels SNPs associats de forma nominal (que no superen correccions per múltiples comparacions), encara que formin part d'haplotips de risc o que estan en LD amb aquests, és precipitat sense haver replicat aquests resultats en d'altres poblacions.

**Taula 18.** Esquema comparatiu dels resultats obtinguts pel gen *DDC* en aquest estudi i en el treball de Todt i col·laboradors (Todt et al. 2009) en comparar casos amb MA i controls.

Aquest estudi, 220 MA/528 controls						Estudi Todt, 270 MA/272controls		
SNPs estudiats	MAF cont	LD	Raó exclusió	P al·lels	Hap Risc	SNPs estudiats	MAF cont	P al·lels
rs7803788	0,23	M		0,90		-		
rs2329340	0,30	M		0,26	x	rs2329341	0,34	1,00
rs10499695	0,49	S		0,18		rs998850	0,45	0,51
rs11974297	0,37	M		0,064	x	-		
rs10499694	NA	M	LD rs10499695					
rs2044859	0,35	S		0,71	x	-		
rs1982406	0,28	M		<b>0,020</b>		-		
rs7809758	-	M	No SNPlex			-		
rs6944090	0,24	M		<b>0,022</b>		-		
rs6592961	0,19	S		0,053		-		
rs3823674	NA	S	LD rs732215			-		
rs2876827	-	M	No SNPlex			rs730092	0,42	0,31
rs732215	0,47	M		0,37		rs1451371	0,47	0,24
						rs1470750	0,43	0,13
rs11761683	0,28	M		0,60	x	-		
rs11238131	0,30	M		0,43		rs4947535	0,30	0,12
-			MAF<0,25			rs11575404	0,03	0,61
-			MAF<0,25			rs4948225	0,002	0,32
-			MAF<0,25			rs2167363	0,03	0,72
-			MAF<0,25			rs2329371	0,22	0,50

MA: migranya amb aura; Cont: controls; MAF: freqüència al·lèlica mínima; LD: desequilibri de lligament; M: SNP representatiu d'un bin (*multitag*); S: bin amb un únic SNP (*singleton*), Hap: haplotip; X: SNPs que formen part de l'haplotip de risc; NA: no analitzat. En color, els marcadors comparables entre els dos estudis

Si es confirmen els resultats obtinguts en rèpliques adequades, el fet que s'hagin identificat haplotips de risc en gens comuns entre el sistema serotoninèrgic i dopaminèrgic recolzaria la participació d'aquests dos sistemes de neurotransmissió en la migranya.

Tot i que les associacions nominals no són significatives, les variacions rs828358, rs7984966 i rs4911871 dels gens *HTR1E*, *HTR2A* i *HTR2C*, respectivament, s'han trobat associades tant a MO com a MA (resultats, article capítol 2, taula 1). A més, aquest resultats s'han mantingut nominalment associats en ajuntar les dues poblacions. Considerant que la MO i la MA tenen una etiologia comú, haver identificat aquestes associacions en els dos grups es podria considerar com una mena de rèplica. Entre aquests tres, els resultats del gen *HTR1E* són particularment interessants i s'haurien d'estudiar en altres poblacions més grans per poder resoldre la seva possible implicació (o no) en la migranya.

### 3.3 Estudi de gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic

Aquesta part de l'estudi s'ha centrat en gens relacionats amb el sistema de neurotransmissió dopaminèrgica, excepte aquells comuns al sistema serotoninèrgic que ja s'havien analitzat en l'apartat anterior. En aquesta ocasió s'ha donat preferència a tenir dues poblacions per poder realitzar un estudi en dues etapes: en primer lloc, realitzar l'estudi cas-control en la primera població, i després analitzar tan sols els marcadors associats a la segona població per intentar confirmar els resultats obtinguts.

Malgrat identificar associació en l'estudi de marcadors individuals en els gens *DRD2* i *TH* que es mantenen significatives després d'aplicar correccions per múltiples comparacions de FDR al 10%, i un haplotip de risc en el gen *DRD2*, també significatiu després de correccions per permutacions, aquests resultats no s'han replicat en la segona població. Això indicaria que possiblement els resultats són associacions espúries degudes a errors de tipus I. No podem descartar, però, que es tracti d'un error de tipus II a la segona població, tenint en compte la mida mostral de la rèplica limitada a només 272 casos i 283 controls.

Pel que fa referència als estudis publicats anteriorment, els resultats obtinguts recolzen que els gens *DRD1*, *DRD3*, *DRD5*, *COMT* i *TH* no participen en la susceptibilitat a migranya. A causa d'incompatibilitats tècniques en el disseny de l'estudi i a problemes de genotipació d'algun SNP, el gen *DRD4* no s'ha pogut estudiar. Pel que fa als gens *DRD2*, *DBH* i *SLC6A3*, els nostres resultats no recolzen alguns dels estudis publicats fins ara.

Els nostres resultats discrepen amb els obtinguts per diversos autors que han detectat associacions entre dues variants diferents del gen *DRD2* i el fenotip MA (taula 9). Aquestes divergències es podrien explicar en cas que aquestes variants conferissin susceptibilitat exclusivament a MA, ja que el nostre estudi té un poder estadístic molt limitat per estudiar els subgrups de MO i MA per separat a la població 1. La taula 13 mostra els SNPs estudiats en el nostre estudi i els seleccionats per Todt i col·laboradors. En aquesta ocasió tan sols 3 SNPs són comparables, i dos més no els hem estudiat perquè tenen una MAF molt baixa; en canvi, s'han inclòs 7 SNPs més per assolir una millor cobertura. Les associacions nominals que hem identificat a la nostra població 1 no es repliquen a la segona població, i una d'elles també és negativa a les dues poblacions alemanyes. En el treball de Todt i col·laboradors identifiquen una associació a la població 1 (polimorfisme que no mostra evidències d'associació a la nostra població 1) que no repliquen a la segona població, però que sí que és significativa en ajuntar les seves dues poblacions. No obstant, en una tercera fase de l'estudi en què augmenten el nombre de controls, els resultats no es mantenen

significatius. El conjunt d'aquestes dades sembla indicar que el gen *DRD2* no participa en el fenotip migranyós. Pel que fa als estudis anteriors, centrats majoritàriament en la variant exònica rs6275, presenten resultats contradictoris. Aquesta variant està en LD amb la rs2242592 estudiada en aquest treball que no s'ha trobat associada. Seran necessaris més estudis i/o meta-anàlisis per aclarir la participació de *DRD2* en la migranya, particularment en la MA.

Pel que fa la participació del gen *DBH* en la migranya, els resultats obtinguts fins ara en diferents estudis són contradictoris. El polimorfisme inicialment identificat en població australiana no s'ha pogut replicar en població alemanya (taula 9; Lea et al. 2000; Todt et al. 2009). En canvi, en aquesta població s'ha identificat el SNP de risc rs2097629. Per altra banda un estudi publicat el 2009 identifica una associació en dues poblacions independents australianes amb un polimorfisme de la regió promotora (rs1611115), prèviament demostrat com a responsable de la variació del 31-52% de l'activitat enzimàtica. Aquest SNP està en cert LD amb la variant identificada anteriorment pel mateix grup (Fernandez et al. 2009). Malauradament, cap d'aquests marcadors s'ha analitzat a la nostra població per incompatibilitats de disseny (resultats, article capítol 3, taula suplementària 1).

El gen *SLC6A3* tan sols s'ha trobat associat a migranya en l'estudi de Todt i col·laboradors. Identifiquen el SNP de risc, rs40184, en ajuntar les dues poblacions i també en comparar amb una mostra ampliada de controls. Aquesta mateixa variant s'ha estudiat en el nostre treball però no s'ha identificat associació a la població 1 i per tant no s'ha estudiat a la població 2.

Curiosament, cap de les tres variants associada a MA de l'estudi de Todt i col·laboradors és significativa en un grup poblacional i també en l'altre. Tot i això, els autors van procedir a l'estudi conjunt. En conseqüència, no es pot dir que presentin una rèplica, sinó que han augmentat la mida mostral per realitzar un estudi amb més poder estadístic. En el nostre treball s'ha seguit una estratègia més astringent: s'ha considerat necessari obtenir resultats significatius a la segona població per passar a les anàlisis conjuntes, i la manca de rèplica s'ha considerat un fals positiu de la població 1. Amb els coneixements actuals no podem saber quina de les estratègies és més correcta.

### **3.4 Estudi de gens relacionats amb l'exocitosi sinàptica**

Vam iniciar l'estudi de gens que participen en processos de regulació de l'exocitosi sinàptica, o neurosecreció, amb l'estudi del gen *STX1A* en una mostra limitada de pacients, uns 200, i mitjançant tècniques de genotipació manual. Aquest estudi



## Discussió

preliminar va identificar una associació nominal amb un dels SNPs, rs941298, i un haplotip de risc. Tot i que aquests resultats no romanien significatius després d'aplicar la correcció per múltiples comparacions de Bonferroni, i pel fet que aquesta és molt conservadora, es va considerar interessant continuar l'estudi d'aquest gen, així com d'altres que participen en el procés de regulació de l'alliberament de vesícules a l'espai sinàptic. Els pacients del primer estudi es van incloure en la genotipació a gran escala de 143 SNPs de 15 gens diferents que participen en processos d'exocitosi neuronal (entre ells *STX1A*). Al final es van poder analitzar 98 SNPs en 538 casos i 538 controls. El marcador rs941298 es va descartar de l'estudi final perquè està en LD amb el rs941299, que presentava un major nombre d'individus genotipats. El LD entre aquests dos marcadors estimat a la nostra sèrie de és de  $r^2=0,98$ , i en conseqüència el SNP rs941299 és representatiu de rs941298. No obstant, l'anàlisi d'aquest marcador no va identificar diferències significatives entre casos i controls per a cap dels grups MO o MA. Això suggereix que els resultats del primer estudi podrien ser falsos positius.

L'estudi de gens candidats per la seva rellevància funcional en la neurotransmissió sinàptica es basa en la hipòtesi que les formes comunes de migranya podrien ser, si més no en part, sinaptopaties, i sabem que diversos canals iònics, els gens d'alguns dels quals estan mutats en pacients FHM, estan implicats en el control de la neurotransmissió. No obstant, un article molt ampli publicat recentment en què s'estudia la participació de 5257 SNPs de 155 gens que codifiquen canals iònics, en un estudi en dues fases, no aconsegueix replicar els resultats obtinguts a la primera població amb MA.

En el nostre estudi s'ha analitzat la població de forma conjunta perquè ara tenim la possibilitat de replicar els resultats, en un futur proper, en una mostra de mida similar recollida a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron per la Unitat de Neurologia. En conseqüència, la rèplica es realitzarà durant els propers mesos.

S'han estudiat un total de 98 SNPs i s'han identificat diverses associacions nominals en els grups de MO i MA. Tan sols dos d'aquests polimorfismes, s'han mantingut significatius després d'aplicar una correcció de FDR al 15% en els gens *CPLX2* pel grup de MO i *NSF* pel grup de MA. S'ha identificat un haplotip de risc en el gen *CPLX2*, rs17065535G-rs6887620G-rs10866692G, en el grup de MO que augmenta el risc fins a quatre vegades. Probablement aquest és un exemple de sobreestimació del risc pel fet d'estimar els haplotips en els grups de casos i controls per separat. També és cert que l'interval de confiança (IC) al 95% del OR és de 2,6 a 7,1, molt ampli, de manera que l'OR real podria estar clarament per sota de 4. D'altra banda, el risc dels portadors de l'haplotip identificat en el gen *NSF* (OR=1,32, 95%IC=1,06-1,66) és menor que el

risc identificat a nivell individual pels portadors de l'al·lel G d'un dels SNPs (rs183211) inclosos en aquest haplotip de risc (OR=3.03, 95%IC=1.49-6.25).

A partir de la taula de distribucions genotípiques es pot fer una observació rellevant pel que fa al SNP rs183211 del gen *NSF* (resultats, capítol 4 (II), taula 1). Aquest polimorfisme està associat nominalment tant en el grup de MA, significació que es manté després d'aplicar correccions per múltiples comparacions, com en el grup de MO, tot i que en aquest darrer cas es perd la significació. El problema sorgeix pel fet que l'al·lel sobrerrepresentat en casos respecte als controls és diferent en els dos grups de MA i MO. Aquesta dada no pot sostenir-se a nivell biològic, ja que és molt difícil que un dels al·lells de la variant confereixi susceptibilitat a MA i per contra sigui de protecció en MO, sobretot considerant que individus amb MA també poden presentar episodis de MO. Per tant, en aquest cas l'associació nominal en el grup de MO és probablement un fals positiu. L'estudi de la segona població ajudarà a dilucidar la possible participació del gen *NSF* en MA. Pel que fa el gen *CPLX2*, hem detectat que el SNP rs10866692 està associat de forma nominal a ambdós fenotips MO i MA. En aquesta ocasió la tendència és del mateix al·lel. No obstant, no s'ha procedit a l'anàlisi conjunta de la mostra perquè els valors de P no superaven el llindar ajustat de significació de FDR al 15%.

Si es confirmen aquestes associacions, es reforçaria la hipòtesi de les formes comunes de migranya com a sinaptopaties i s'ampliaria el camp de possibles gens candidats a estudiar.

## 4 Perspectives de futur en l'estudi de les malalties complexes com la migranya

Els estudis d'associació van començar amb l'anàlisi d'algunes variants funcionals en gens candidats concrets (associació directa), i posteriorment van derivar cap a la utilització de criteris de cobertura genètica dels gens candidats basats en patrons de LD, que implica l'anàlisi de variants no necessàriament funcionals (associació indirecta). Actualment l'estudi de gens concrets sovint ha obert pas a l'estudi de sistemes gènics que cobreixen vies funcionals completes, i des de fa pocs anys s'està fent el salt a l'estudi de variants polimòrfiques que cobreixen tot el genoma, i que representen la major part de la variabilitat existent.

### 4.1 Els estudis d'associació a escala genòmica

En contrast amb el estudis d'associació de gens candidats en què se seleccionen els SNPs en gens o regions candidates hi ha els estudis d'associació a escala genòmica (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS), que analitzen sistemàticament milers o milions de SNPs distribuïts al llarg de tot el genoma humà sense una hipòtesi específica de partida sobre la possible identitat de les variants de susceptibilitat. Aquest abordatge és especialment interessant per a aquelles patologies en què no es coneixen amb certesa les bases fisiopatològiques. En general els GWAS han identificat de forma més freqüent gens prèviament insospitats, demostrant el potencial dels cribratges genètics a l'hora de descobrir nous processos biològics (McCarthy i Hirschhorn 2008). Fins ara no s'ha publicat cap estudi de tipus GWAS per a la migranya o alguns dels subgrups clínics, tot i que el consorci EUROHEAD, que reuneix grups europeus, ha realitzat un estudi d'aquest tipus que està en vies de publicació. Els GWAS podrien aportar noves dades per aprofundir en les bases fisiopatològiques d'aquest trastorn i identificar noves dianes terapèutiques.

Els GWAS han esdevingut molt populars aquests darrers anys, però requereixen un nombre molt elevat de mostres ben caracteritzades clínicament i controls recollits de forma adequada. El nombre de mostres i polimorfismes (de tipus SNP) a genotipar fa que el cost dels estudis sigui encara avui dia molt elevat. Hi ha diverses empreses que

ofereixen diferents col·leccions de polimorfismes amb diferents graus de cobertura genètica per tal de capturar la majoria de les variacions conegudes. Hi ha, per exemple, l'*Affymetrix genome-wide human SNP array 6.0* (~10<sup>6</sup> SNPs) o l'*Illumina Human1M BeadChip* (~10<sup>6</sup> SNPs). L'augment espectacular d'individus (actualment es treballa sovint amb milers d'individus) i polimorfismes (milions) obliga als laboratoris a disposar de més poder biocomputacional (Ziegler et al. 2008).

Per altra banda, l'estudi dels marcadors a nivell individual en un GWAS és equivalent als estudis cas-control clàssics que se centren en gens candidats concrets, però amb el problema afegit que l'aplicació de les correccions per múltiples comparacions suposa una selecció molt severa dels positius obtinguts (Ziegler et al. 2008). El tema de quines correccions cal aplicar als GWAS és un dels principals motius de debat. Trobar un punt d'equilibri entre errors de tipus I i II és necessari per seleccionar quins polimorfismes cal estudiar amb més profunditat. En moltes ocasions el GWAS forma part d'un estudi en múltiples etapes. Els marcadors associats de forma més significativa en el GWAS inicial s'estudien a posteriori en mostres generalment més grans per confirmar o descartar l'existència de l'associació. D'aquesta manera, els estudis requereixen un nombre de mostres enorme que moltes vegades no es poden recollir en un sol centre. Amb l'objectiu de reclutar mostres de milers de pacients, els grups de diferents països tendeixen a agrupar-se en consorcis per realitzar estudis combinats. En el cas de la migranya, l'article de Nyholt i col·laboradors és un exemple de consorci internacional en què s'han agrupat mostres procedents de quatre centres diferents i s'estudien 155 gens seguint criteris de cobertura genètica (Nyholt et al. 2008).

Els GWAS actuals tan sols poden tenir èxit si la hipòtesis de malaltia comuna/variant comuna és correcta, de manera que les malalties complexes estarien causades per un nombre moderat de *loci* amb variants comunes. Si aquesta hipòtesi és falsa, per exemple si en realitat hi ha múltiples variants rares en el *locus* de la malaltia, mapar l'associació serà molt més difícil.

## 4.2 Altres variants implicades en malalties complexes

Els GWAS actuals se centren en l'estudi de SNPs i no avaluen la contribució d'altres tipus de variants genètiques com per exemple els VNTRs o els microsatèl·lits. Sí que contempen, en canvi, l'anàlisi de les principals variants estructurals de grans dimensions, les anomenades variants de número de còpia (CNVs) que contribueixen de forma significativa a la diversitat genètica a les poblacions humanes, i que ja s'han relacionat amb alguns trastorns genètics. Es coneixen al voltant de 1500 regions de

tipus CNV i s'ha estimat que representen un 12-15% de la seqüència del genoma humà. Encara que la funció dels CNVs no és ben coneguda, el fet que cobreixin més nucleòtids que els SNPs emfatitza la seva importància en la diversitat genètica i l'evolució humana. Molts d'aquests CNVs estan situats en regions mal cobertes pels dissenys actuals de GWAS o no estudiades en el projecte HapMap. En conseqüència, la contribució dels CNVs en les malalties complexes ha estat encara poc estudiada. No obstant, per a algunes malalties complexes s'han identificat associacions amb CNVs, tot indicant que aquest tipus de variant pot ser molt rellevant per a algunes patologies (Estivill i Armengol 2007).

### **4.3 El projecte dels 1000 genomes**

El projecte dels 1000 genomes ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)), presentat el gener de 2008, està gestionat per un consorci internacional de recerca amb l'objectiu de crear un nou catàleg genètic molt més detallat de les variacions del genoma humà a partir de la seqüenciació completa d'aproximadament 1200 genomes. Això proporcionarà una visió en alta resolució dels polimorfismes potencialment rellevants a nivell biomèdic (Hayden 2008). Aquest nou mapa permetrà identificar polimorfismes de tot tipus (SNPs, CNVs, insercions i delecions) presents al genoma amb freqüències superiors a l'1% en general i fins al 0,1-0,5% per a les variants localitzades en gens. El projecte permetrà també determinar els patrons de desequilibri de lligament. Tot plegat servirà per accelerar futurs estudis sobre trastorns específics, augmentant el poder de detecció de la variant de risc, dissenyar nous estudis amb una major cobertura, i pot ajudar a millorar els mètodes d' 'imputació' o 'predicció' de SNPs no genotipats en els projectes ja realitzats.

Per començar, s'han dissenyat tres estudis pilot a desenvolupar en els propers anys mitjançant les noves tecnologies de seqüenciació. El primer programa consisteix a seqüenciar el genoma sencer de sis individus, de dues famílies nuclears, a alta resolució. El segon estudi pilot consisteix a genotipar 180 individus de tres grups ètnics diferents a menys resolució. I en el tercer programa pilot se seqüenciaran les regions codificants de 1000 gens per a 1000 individus a alta resolució.

### **4.4 Recursos necessaris per progressar en els estudis d'associació a partir dels coneixements actuals**

La replicació d'una associació és tan sols l'inici del procés que condueix cap a la identificació de la variant funcionalment rellevant. A continuació caldrà el treball intensiu i costós de seqüenciar l'interval en profunditat, genotipar totes les variants

comunes i potser les menys comunes que són d'interès en múltiples poblacions, entendre les seves conseqüències funcionals, examinar les seves potencials interaccions amb altres gens i factors ambientals i dissenyar estratègies per a la prevenció o intervenció terapèutica. Cap d'aquests passos s'hauria de seguir sense rèpliques concloents de les troballes d'una associació genotip-fenotip inicial (Chanock et al. 2007).

Gràcies a la seqüenciació del genoma humà, al projecte HapMap i als avenços tecnològics, la recerca en el camp de les malalties complexes s'ha accelerat molt durant els darrers anys. Però per continuar avançant caldrà assolir algunes fites. Cada vegada es necessiten mostres més grans de casos i controls a més de tenir múltiples cohorts de diverses poblacions. Caldrà que es completin els coneixements de les variants al llarg del genoma en múltiples poblacions, així com els seus patrons de LD. És necessari desenvolupar nous mètodes per detectar de forma eficient estratificació en mostres grans. També cal millorar els mètodes de detecció de variants de baixa freqüència. Arrel del progrés de les noves tecnologies de seqüenciació a molt gran escala, s'hauran de desenvolupar mètodes computacionals per interpretar dades obtingudes de la seqüenciació de poblacions àmplies. A més, és possible que en els propers anys la seqüenciació de genomes complets substitueixi els mètodes de genotipació actuals, oferint molta més informació. També es disposa de dades d'expressió (a nivell de RNA) de gairebé tots els gens humans en diversos teixits, però es podria ampliar el ventalls de teixits estudiats. S'ha de millorar l'anotació del genoma, consensuar les nomenclatures, especialment a les regions no codificants. De cara als gens en què s'han identificat associacions s'hauran de realitzar estudis funcionals rellevants i validats. Seria d'especial interès identificar o crear models animals o models *in vitro* representatius per avaluar la funcionalitat de les variants de risc. De cara als aspectes més desconeguts de les malalties complexes, caldrà una recollida coordinada d'exposicions ambientals i de dades fenotípiques en cohorts àmplies d'individus amb mostra d'ADN disponible per poder avaluar la contribució dels factors ambientals. Per això també caldrà implementar mètodes computacionals per al càlcul exhaustiu de l'efecte d'interaccions gen-gen i gen-ambient. També serà necessari avaluar el paper dels efectes epigenètics en el risc de presentar una malaltia (McCarthy i Hirschhorn 2008). Podem dir que, tot i que s'ha avançat molt en el camp dels estudis d'associació genètica, encara queden molts interrogants oberts, i seran necessaris esforços coordinats multidisciplinaris per poder aprofundir en el coneixement de les bases genètiques de les malalties complexes.



# CONCLUSIONS







# CONCLUSIONS

S'ha avaluat la participació en la susceptibilitat a la migranya comuna o a algun dels seus dos subtipus clínics principals, migranya sense aura (MO) i migranya amb aura (MA), de 45 gens candidats mitjançant estudis d'associació de tipus cas-control de 255 variants polimòrfiques, seleccionades principalment en base a criteris de cobertura gènica. Aquest treball s'ha centrat en sistemes de gens candidats que codifiquen proteïnes funcionalment relacionades.

1. L'estudi de polimorfismes sinònims del gen que codifica el receptor d'estrògens *ESR1* i d'una inserció *Alu* del gen del receptor de progesterona *PGR* no recolzen la participació d'aquestes variants en la migranya, en oposició a estudis previs realitzats en altres poblacions.

2. S'han estudiat 19 gens del sistema serotoninèrgic en una població àmplia i s'han identificat haplotips de risc en els gens del receptor 2B de serotonina (*HTR2B*) i de la monoamina oxidasa A (*MAOA*) en el grup de MO, i en el gen de la decarboxilasa d'aminoàcids aromàtics (*ADDC* o *DDC*) en el grup de MA, resultats que es mantenen significatius en aplicar correccions per comparacions múltiples. La *AADC* i la *MAOA* participen, respectivament, en la síntesi i degradació de serotonina i de dopamina. De replicar-se aquestes associacions en d'altres poblacions es confirmaria la participació d'aquests dos sistemes de neurotransmissió en la susceptibilitat a migranya.

3. S'han analitzat SNPs de 9 gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic seguint un disseny en dues etapes. S'han identificat associacions nominals en cinc gens, dues de les quals es mantenen significatives després d'aplicar correccions per múltiples comparacions. Malauradament, cap d'aquestes associacions s'ha replicat en una segona mostra.

4. L'anàlisi del gen de la sintaxina 1A (*STX1A*) a la migranya ha mostrat en un primer estudi una associació nominal que es manté en doblar els controls. Els resultats obtinguts en ampliar el número de casos i de controls en un segon estudi indiquen que es podria tractar d'un fals positiu.

5. S'ha estudiat la participació en la migranya de 15 nous gens candidats que codifiquen proteïnes implicades en la regulació de la neurosecreció. S'ha identificat un haplotip de susceptibilitat a MO en el gen de la complexina 2 (*CPLX2*), que codifica

## Conclusions

una proteïna reguladora dels passos finals de la fusió de membranes per l'alliberament de neurotransmissors. D'altra banda, s'ha identificat una associació entre un SNP del gen *NSF*, que codifica la proteïna responsable de la reactivació dels elements de fusió, i el grup de MA. Aquestes associacions estan pendents de rèplica, però podrien aportar una nova evidència a favor de la hipòtesi d'una disfunció sinàptica en alguns trastorns neurològics paroxítics.

6. La identificació d'associacions específiques de MO o MA suggereix que aquests trastorns tenen, com a mínim en part, factors de susceptibilitat específics. D'altra banda s'han identificat alguns polimorfismes associats a ambdós grups, tot recolzant també l'existència de factors etiològics comuns.

7. Aquest treball exemplifica el fet que els resultats dels estudis de variants comunes que, individualment, tenen un efecte menor sobre el risc global a patir una malaltia, requereixen sèries de pacients molt àmplies i rèpliques en d'altres poblacions abans de poder ser acceptats per la comunitat científica.

# BIBLIOGRAFIA





- (1991) Treatment of migraine attacks with sumatriptan. The Subcutaneous Sumatriptan International Study Group. *N Engl J Med* 325:316-21
- (2003) The International HapMap Project. *Nature* 426:789-96
- (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299-320
- A**bou-Sleiman PM, Hanna MG, Wood NW (2006) Genetic association studies of complex neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:1302-4
- Akerman S, Goadsby PJ (2005) The role of dopamine in a model of trigeminovascular nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 314:162-9
- Akerman S, Goadsby PJ (2007) Dopamine and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia* 27:1308-14
- Ambrosini A, D'Onofrio M, Grieco GS, Di Mambro A, Montagna G, Fortini D, Nicoletti F, Nappi G, Sances G, Schoenen J, Buzzi MG, Santorelli FM, Pierelli F (2005) Familial basilar migraine associated with a new mutation in the ATP1A2 gene. *Neurology* 65:1826-8
- Andlin-Sobocki P, Jonsson B, Wittchen HU, Olesen J (2005) Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol* 12 Suppl 1:1-27
- Anttila V, Kallela M, Oswell G, Kaunisto MA, Nyholt DR, Hamalainen E, Havanka H, Ilmavirta M, Terwilliger J, Sobel E, Peltonen L, Kaprio J, Farkkila M, Wessman M, Palotie A (2006) Trait components provide tools to dissect the genetic susceptibility of migraine. *Am J Hum Genet* 79:85-99
- Anttila V, Nyholt DR, Kallela M, Arto V, Vepsalainen S, Jakkula E, Wennerstrom A, Tikka-Kleemola P, Kaunisto MA, Hamalainen E, Widen E, Terwilliger J, Merikangas K, Montgomery GW, Martin NG, Daly M, Kaprio J, Peltonen L, Farkkila M, Wessman M, Palotie A (2008) Consistently replicating locus linked to migraine on 10q22-q23. *Am J Hum Genet* 82:1051-63
- Aurora SK, Wilkinson F (2007) The brain is hyperexcitable in migraine. *Cephalalgia* 27:1442-53
- B**alding DJ (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7:781-91
- Barnette T, Gourraud PA, Cambon-Thomsen A (2005) Strategies in analysis of the genetic component of multifactorial diseases; biostatistical aspects. *Transpl Immunol* 14:255-66
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-5
- Barszczewski M, Chua JJ, Stein A, Winter U, Heintzmann R, Zilly FE, Fasshauer D, Lang T, Jahn R (2008) A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion. *Mol Biol Cell* 19:776-84
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-33
- Bergerot A, Storer RJ, Goadsby PJ (2007) Dopamine inhibits trigeminovascular transmission in the rat. *Ann Neurol* 61:251-62
- Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci* 30:185-7
- Bjornsson A, Gudmundsson G, Gudfinnsson E, Hrafnisdottir M, Benedikz J, Skuladottir S, Kristjansson K, Frigge ML, Kong A, Stefansson K, Gulcher JR (2003) Localization of a gene for migraine without aura to chromosome 4q21. *Am J Hum Genet* 73:986-93
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291-336
- Blencowe BJ (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25:106-10
- Bodmer W, Bonilla C (2008) Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 40:695-701

## Bibliografia

- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8:136-42
- Borroni B, Brambilla C, Liberini P, Rao R, Archetti S, Gipponi S, Volta GD, Padovani A (2005) Functional serotonin 5-HTTLPR polymorphism is a risk factor for migraine with aura. *J Headache Pain* 6:182-4
- Borroni B, Brambilla C, Liberini P, Rao R, Archetti S, Venturelli E, Gipponi S, Caimi L, Padovani A (2006a) Investigating the association between Notch3 polymorphism and migraine. *Headache* 46:317-21
- Borroni B, Rao R, Liberini P, Venturelli E, Cossandi M, Archetti S, Caimi L, Padovani A (2006b) Endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) polymorphism is an independent risk factor for migraine with aura. *Headache* 46:1575-9
- Brandes JL (2006) The influence of estrogen on migraine: a systematic review. *Jama* 295:1824-30
- Burnet PW, Harrison PJ, Goodwin GM, Battersby S, Ogilvie AD, Olesen J, Russell MB (1997) Allelic variation in the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene and migraine. *Neuroreport* 8:2651-3
- C**ader ZM, Noble-Topham S, Dymont DA, Cherny SS, Brown JD, Rice GP, Ebers GC (2003) Significant linkage to migraine with aura on chromosome 11q24. *Hum Mol Genet* 12:2511-7
- Calabresi P, Galletti F, Rossi C, Sarchielli P, Cupini LM (2007) Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 28:188-95
- Cardon LR, Abecasis GR (2003) Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet* 19:135-40
- Cardon LR, Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2:91-9
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA (2004) Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 74:106-20
- Carlsson A, Forsgren L, Nylander PO, Hellman U, Forsman-Semb K, Holmgren G, Holmberg D, Holmberg M (2002) Identification of a susceptibility locus for migraine with and without aura on 6p12.2-p21.1. *Neurology* 59:1804-7
- Carr CM, Munson M (2007) Tag team action at the synapse. *EMBO Rep* 8:834-8
- Cevoli S, Mochi M, Scapoli C, Marzocchi N, Pierangeli G, Pini LA, Cortelli P, Montagna P (2006) A genetic association study of dopamine metabolism-related genes and chronic headache with drug abuse. *Eur J Neurol* 13:1009-13
- Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, Hirschhorn JN, et al. (2007) Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 447:655-60
- Chugani DC, Niimura K, Chaturvedi S, Muzik O, Fakhouri M, Lee ML, Chugani HT (1999) Increased brain serotonin synthesis in migraine. *Neurology* 53:1473-9
- Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361:865-72
- Colson NJ, Fernandez F, Lea RA, Griffiths LR (2007) The search for migraine genes: an overview of current knowledge. *Cell Mol Life Sci* 64:331-44
- Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, Griffiths LR (2006) No role for estrogen receptor 1 gene intron 1 Pvu II and exon 4 C325G polymorphisms in migraine susceptibility. *BMC Med Genet* 7:12
- Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, MacMillan J, Griffiths LR (2004) The estrogen receptor 1 G594A polymorphism is associated with migraine susceptibility in two independent case/control groups. *Neurogenetics* 5:129-33
- Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, MacMillan J, Griffiths LR (2005) Investigation of hormone receptor genes in migraine. *Neurogenetics* 6:17-23

- Coppola G, Vandenheede M, Di Clemente L, Ambrosini A, Fumal A, De Pasqua V, Schoenen J (2005) Somatosensory evoked high-frequency oscillations reflecting thalamo-cortical activity are decreased in migraine patients between attacks. *Brain* 128:98-103
- Cordell HJ (2002) Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum Mol Genet* 11:2463-8
- Cordell HJ, Clayton DG (2005) Genetic association studies. *Lancet* 366:1121-31
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Fiumara A, Barone R, Vilageliu L, Chabas A (1997) Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analyses. *Am J Med Genet* 70:437-43
- Corral J, Iriesta JA, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Vicente V (1998) Migraine and prothrombotic genetic risk factors. *Cephalalgia* 18:257-60
- Cuenca-Leon E, Corominas R, Fernandez-Castillo N, Volpini V, Del Toro M, Roig M, Macaya A, Cormand B (2008) Genetic analysis of 27 Spanish patients with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and childhood periodic syndromes. *Cephalalgia* 28:1039-47
- Cuenca-Leon E, Corominas R, Montfort M, Artigas J, Roig M, Bayes M, Cormand B, Macaya A (2009) Familial hemiplegic migraine: linkage to chromosome 14q32 in a Spanish kindred. *Neurogenetics*
- Curran-Everett D (2000) Multiple comparisons: philosophies and illustrations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1-8
- Curtain R, Lea RA, Quinlan S, Bellis C, Tajouri L, Hughes R, Macmillan J, Griffiths LR (2004) Investigation of the low-density lipoprotein receptor gene and cholesterol as a risk factor for migraine. *J Neurol Sci* 227:95-100
- Curtain R, Sundholm J, Lea R, Ovcarić M, MacMillan J, Griffiths L (2005a) Association analysis of a highly polymorphic CAG Repeat in the human potassium channel gene KCNN3 and migraine susceptibility. *BMC Med Genet* 6:32
- Curtain RP, Lea RA, Tajouri L, Haupt LM, Ovcarić M, MacMillan J, Griffiths LR (2005b) Analysis of chromosome 1 microsatellite markers and the FHM2-ATP1A2 gene mutations in migraine pedigrees. *Neurol Res* 27:647-52
- D**alkara T, Zervas NT, Moskowitz MA (2006) From spreading depression to the trigeminovascular system. *Neurol Sci* 27 Suppl 2:S86-90
- Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES (2001) High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 29:229-32
- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, Ballabio A, Aridon P, Casari G (2003) Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 33:192-6
- de Sousa SC, Karwautz A, Wober C, Wagner G, Breen G, Zesch HE, Konrad A, Zormann A, Wanner C, Kienbacher C, Collier DA, Wober-Bingol C (2007) A dopamine D4 receptor exon 3 VNTR allele protecting against migraine without aura. *Ann Neurol* 61:574-8
- Del Zompo M, Cherchi A, Palmas MA, Ponti M, Bocchetta A, Gessa GL, Piccardi MP (1998) Association between dopamine receptor genes and migraine without aura in a Sardinian sample. *Neurology* 51:781-6
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AM, Pusch M, Strom TM (2005) Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366:371-7
- Dodick DW (2008) Examining the essence of migraine--is it the blood vessel or the brain? A debate. *Headache* 48:661-7
- Ducros A (2008) [Familial and sporadic hemiplegic migraine]. *Rev Neurol (Paris)* 164:216-24
- Ducros A, Denier C, Joutel A, Cecillon M, Lescoat C, Vahedi K, Darcel F, Vicaut E, Bousser MG, Tournier-Lasserre E (2001) The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *N Engl J Med* 345:17-24



## Bibliografia

- Ducros A, Joutel A, Vahedi K, Cecillon M, Ferreira A, Bernard E, Verier A, Echenne B, Lopez de Munain A, Bousser MG, Tournier-Lasserre E (1997) Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21-q23 and evidence of further heterogeneity. *Ann Neurol* 42:885-90
- Dudbridge F (2003) Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25:115-21
- Dudbridge F (2008) Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 66:87-98
- E**berle MA, Ng PC, Kuhn K, Zhou L, Peiffer DA, Galver L, Viaud-Martinez KA, Lawley CT, Gunderson KL, Shen R, Murray SS (2007) Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels. *PLoS Genet* 3:1827-37
- Eikermann-Haerter K, Kudo C, Moskowitz MA (2007) Cortical spreading depression and estrogen. *Headache* 47 Suppl 2:S79-85
- Emin Erdal M, Herken H, Yilmaz M, Bayazit YA (2001) Significance of the catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in migraine. *Brain Res Mol Brain Res* 94:193-6
- Erdal ME, Herken H, Yilmaz M, Bayazit YA (2001) Association of the T102C polymorphism of 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene with aura in migraine. *J Neurol Sci* 188:99-101
- Erdal N, Herken H, Yilmaz M, Erdal E, Bayazit YA (2007) The A218C polymorphism of tryptophan hydroxylase gene and migraine. *J Clin Neurosci* 14:249-51
- Estevez M (2006) Invertebrate modeling of a migraine channelopathy. *Headache* 46 Suppl 1:S25-31
- Estevez M, Gardner KL (2004) Update on the genetics of migraine. *Hum Genet* 114:225-35
- Estivill X, Armengol L (2007) Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet* 3:1787-99
- F**allin D, Schork NJ (2000) Accuracy of haplotype frequency estimation for biallelic loci, via the expectation-maximization algorithm for unphased diploid genotype data. *Am J Hum Genet* 67:947-59
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567-87
- Fernandez F, Colson N, Quinlan S, Macmillan J, Lea RA, Griffiths LR (2009) Association between migraine and a functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus. *Neurogenetics*
- Fernandez F, Curtain RP, Colson NJ, Ovcaric M, MacMillan J, Griffiths LR (2007) Association analysis of chromosome 1 migraine candidate genes. *BMC Med Genet* 8:57
- Fernandez F, Esposito T, Lea RA, Colson NJ, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Griffiths LR (2008) Investigation of gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptors genes and migraine susceptibility. *BMC Med Genet* 9:109
- Fernandez F, Lea RA, Colson NJ, Bellis C, Quinlan S, Griffiths LR (2006) Association between a 19 bp deletion polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase (DBH) locus and migraine with aura. *J Neurol Sci* 251:118-23
- Ferrari MD (2008) Migraine genetics: a fascinating journey towards improved migraine therapy. *Headache* 48:697-700
- Ferrari MD, Odink J, Tapparelli C, Van Kempen GM, Pennings EJ, Bruyn GW (1989) Serotonin metabolism in migraine. *Neurology* 39:1239-42
- Ferrari MD, Saxena PR (1993) On serotonin and migraine: a clinical and pharmacological review. *Cephalalgia* 13:151-65
- Ferro A, Castro MJ, Lemos C, Santos M, Sousa A, Pereira-Monteiro J, Sequeiros J, Maciel P (2008) The C677T polymorphism in MTHFR is not associated with migraine in Portugal. *Dis Markers* 25:107-13

- Filic V, Vladoic A, Stefulj J, Cicin-Sain L, Balija M, Susic Z, Jernej B (2005) Monoamine oxidases A and B gene polymorphisms in migraine patients. *J Neurol Sci* 228:149-53
- Fink KB, Gothert M (2007) 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* 59:360-417
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449:851-61
- G**abriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225-9
- Garcia-Martin E, Martinez C, Serrador M, Alonso-Navarro H, Navacerrada F, Agundez JA, Jimenez-Jimenez FJ (2008) Histamine-N-methyl transferase polymorphism and risk for migraine. *Headache* 48:1343-8
- Gardner K, Barmada MM, Ptacek LJ, Hoffman EP (1997) A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31. *Neurology* 49:1231-8
- Gardner KL (2006) Genetics of migraine: an update. *Headache* 46 Suppl 1:S19-24
- Gardner M, Bertranpetit J, Comas D (2008) Worldwide genetic variation in dopamine and serotonin pathway genes: Implications for association studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1070-5
- Gargus JJ, Tournay A (2007) Novel mutation confirms seizure locus SCN1A is also familial hemiplegic migraine locus FHM3. *Pediatr Neurol* 37:407-10
- Gervil M, Ulrich V, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB (1999) Migraine without aura: a population-based twin study. *Ann Neurol* 46:606-11
- Girault JA, Greengard P (2004) The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* 61:641-4
- Goadsby PJ (2005) Migraine pathophysiology. *Headache* 45 Suppl 1:S14-24
- Goadsby PJ (2008) The vascular theory of migraine--a great story wrecked by the facts. *Brain*
- Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD (2002) Migraine--current understanding and treatment. *N Engl J Med* 346:257-70
- Gonda X, Rihmer Z, Juhasz G, Zsombok T, Bagdy G (2007) High anxiety and migraine are associated with the s allele of the 5HTTLPR gene polymorphism. *Psychiatry Res* 149:261-6
- Gonzalez-Neira A, Calafell F, Navarro A, Lao O, Cann H, Comas D, Bertranpetit J (2004) Geographic stratification of linkage disequilibrium: a worldwide population study in a region of chromosome 22. *Hum Genomics* 1:399-409
- Gordon D, Finch SJ (2005) Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *J Clin Invest* 115:1408-18
- Gordon D, Finch SJ, Nothnagel M, Ott J (2002) Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors are present: application to single nucleotide polymorphisms. *Hum Hered* 54:22-33
- Gordon D, Levenstien MA, Finch SJ, Ott J (2003) Errors and linkage disequilibrium interact multiplicatively when computing sample sizes for genetic case-control association studies. *Pac Symp Biocomput*:490-501
- Goudet J (1995) Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *J Hered* 86:485-486
- Granziera C, DaSilva AF, Snyder J, Tuch DS, Hadjikhani N (2006) Anatomical alterations of the visual motion processing network in migraine with and without aura. *PLoS Med* 3:e402
- Gratacos M, Costas J, de Cid R, Bayes M, Gonzalez JR, Baca-Garcia E, de Diego Y, Fernandez-Aranda F, Fernandez-Piqueras J, Guitart M, Martin-Santos R, Martorell L, Menchon JM, Roca M, Saiz-Ruiz J, Sanjuan J, Torrens M, Urretavizcaya M, Valero J, Vilella E, Estivill X, Carracedo A (2008) Identification of new putative susceptibility

## Bibliografia

- genes for several psychiatric disorders by association analysis of regulatory and non-synonymous SNPs of 306 genes involved in neurotransmission and neurodevelopment. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*
- Griffiths LR, Nyholt DR, Curtain RP, Goadsby PJ, Brimage PJ (1997) Migraine association and linkage studies of an endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene polymorphism. *Neurology* 49:614-7
- Gu CC, Yu K, Rao DC (2008) Characterization of LD structures and the utility of HapMap in genetic association studies. *Adv Genet* 60:407-35
- Gupta S, Mehrotra S, Villalon CM, Perusquia M, Saxena PR, MaassenVanDenBrink A (2007) Potential role of female sex hormones in the pathophysiology of migraine. *Pharmacol Ther* 113:321-40
- H**aan J, van den Maagdenberg AM, Brouwer OF, Ferrari MD (2008) Migraine and epilepsy: genetically linked? *Expert Rev Neurother* 8:1307-11
- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA (2001) Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4687-92
- Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Zwart JA (2006) The association between headache and Val158Met polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: the HUNT Study. *J Headache Pain* 7:70-4
- Hamel E (2007) Serotonin and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia* 27:1293-300
- Hamelsky SW, Lipton RB (2006) Psychiatric comorbidity of migraine. *Headache* 46:1327-33
- Hardisty RM, Stacey RS (1955) 5-Hydroxytryptamine in normal human platelets. *J Physiol* 130:711-20
- Hargreaves R (2007) New migraine and pain research. *Headache* 47 Suppl 1:S26-43
- Haut SR, Bigal ME, Lipton RB (2006) Chronic disorders with episodic manifestations: focus on epilepsy and migraine. *Lancet Neurol* 5:148-57
- Hayden EC (2008) International genome project launched. *Nature* 451:378-9
- Headache Committee on Classification (1962) Classification of Headache. *Jama* 18:268-271
- Hegerl U, Juckel G (1993) Intensity dependence of auditory evoked potentials as an indicator of central serotonergic neurotransmission: a new hypothesis. *Biol Psychiatry* 33:173-87
- Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66:2621-4
- Herzog AG (2007) Neuroactive properties of reproductive steroids. *Headache* 47 Suppl 2:S68-78
- Hohoff C, Marziniak M, Lesch KP, Deckert J, Sommer C, Mossner R (2007) An adenosine A2A receptor gene haplotype is associated with migraine with aura. *Cephalalgia* 27:177-81
- Hoyer D, Martin G (1997) 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* 36:419-28
- I**adecola C (2002) From CSD to headache: a long and winding road. *Nat Med* 8:110-2
- IHS (1988) Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. *Cephalalgia* 8 Suppl 7:1-96
- IHS (2004) The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24 Suppl 1:9-160
- Iles MM (2008) What can genome-wide association studies tell us about the genetics of common disease? *PLoS Genet* 4:e33

- Iniesta JA, Corral J, Gonzalez-Conejero R, Diaz Ortuno A, Martinez Navarro ML, Vicente V (2001) Role of factor XIII Val 34 Leu polymorphism in patients with migraine. *Cephalalgia* 21:837-41
- Iversen SD, Iversen LL (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 30:188-93
- Izzati-Zade KF (2008) The role of serotonin in the pathogenesis and clinical presentations of migraine attacks. *Neurosci Behav Physiol* 38:501-5
- J**en JC, Graves TD, Hess EJ, Hanna MG, Griggs RC, Baloh RW (2007) Primary episodic ataxias: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain* 130:2484-93
- Jen JC, Kim GW, Dudding KA, Baloh RW (2004) No mutations in CACNA1A and ATP1A2 in probands with common types of migraine. *Arch Neurol* 61:926-8
- Jensen R, Stovner LJ (2008) Epidemiology and comorbidity of headache. *Lancet Neurol* 7:354-61
- Jette N, Patten S, Williams J, Becker W, Wiebe S (2008) Comorbidity of migraine and psychiatric disorders--a national population-based study. *Headache* 48:501-16
- Johnson KW, Nelson DL, Dieckman DK, Wainscott DB, Lucaites VL, Audia JE, Owton WM, Phebus LA (2003a) Neurogenic dural protein extravasation induced by meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) involves nitric oxide and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation. *Cephalalgia* 23:117-23
- Johnson MP, Griffiths LR (2005) A genetic analysis of serotonergic biosynthetic and metabolic enzymes in migraine using a DNA pooling approach. *J Hum Genet* 50:607-10
- Johnson MP, Lea RA, Colson NJ, Macmillan JC, Griffiths LR (2005) A population genomics overview of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene and its relationship to migraine susceptibility. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51:285-92
- Johnson MP, Lea RA, Curtain RP, MacMillan JC, Griffiths LR (2003b) An investigation of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene as a migraine candidate gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 117B:86-9
- Joshi G, Pradhan S, Mittal B (2009) Role of the ACE ID and MTHFR C677T polymorphisms in genetic susceptibility of migraine in a north Indian population. *J Neurol Sci* 277:133-7
- Joutel A, Bousser MG, Biousse V, Labauge P, Chabriat H, Nibbio A, Maciazek J, Meyer B, Bach MA, Weissenbach J, et al. (1993) A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nat Genet* 5:40-5
- Judit A, Sandor PS, Schoenen J (2000) Habituation of visual and intensity dependence of auditory evoked cortical potentials tends to normalize just before and during the migraine attack. *Cephalalgia* 20:714-9
- Juhasz G, Zsombok T, Laszik A, Gonda X, Sotonyi P, Faludi G, Bagdy G (2003a) Association analysis of 5-HTTLPR variants, 5-HT<sub>2a</sub> receptor gene 102T/C polymorphism and migraine. *J Neurogenet* 17:231-40
- Juhasz G, Zsombok T, Laszik A, Jakus R, Faludi G, Sotonyi P, Bagdy G (2003b) Despite the general correlation of the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism (5-HTTLPR) and platelet serotonin concentration, lower platelet serotonin concentration in migraine patients is independent of the 5-HTTLPR variants. *Neurosci Lett* 350:56-60
- K**ahlig KM, Rhodes TH, Pusch M, Freilinger T, Pereira-Monteiro JM, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Dichgans M, George AL, Jr. (2008) Divergent sodium channel defects in familial hemiplegic migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9799-804
- Kalfakis N, Panas M, Vassilopoulos D, Malliara-Loulakaki S (1996) Migraine with aura: segregation analysis and heritability estimation. *Headache* 36:320-2
- Kallela M, Wessman M, Havanka H, Palotie A, Farkkila M (2001) Familial migraine with and without aura: clinical characteristics and co-occurrence. *Eur J Neurol* 8:441-9
- Kalra AA, Elliott D (2007) Acute migraine: Current treatment and emerging therapies. *Ther Clin Risk Manag* 3:449-59

## Bibliografia

- Kara I, Ozkok E, Aydin M, Orhan N, Cetinkaya Y, Gencer M, Kilic G, Tireli H (2007) Combined effects of ACE and MMP-3 polymorphisms on migraine development. *Cephalalgia* 27:235-43
- Kara I, Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kilic G (2003) Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk. *Brain Res Mol Brain Res* 111:84-90
- Karwautz A, Campos de Sousa S, Konrad A, Zesch HE, Wagner G, Zormann A, Wanner C, Breen G, Ray M, Kienbacher C, Natriashvili S, Collier DA, Wober C, Wober-Bingol C (2008) Family-based association analysis of functional VNTR polymorphisms in the dopamine transporter gene in migraine with and without aura. *J Neural Transm* 115:91-5
- Karwautz AF, Campos de Sousa S, Wober C, Wagner G, Li T, Konrad A, Zesch HE, Zormann A, Berger G, Wanner C, Wober-Bingol C, Collier DA (2007) Family-based analysis of serotonin transporter gene polymorphisms in migraine with and without aura. *Cephalalgia* 27:773-80
- Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Kilpikari R, Havanka H, Harno H, Nissila M, Sako E, Ilmavirta M, Liukkonen J, Teirmaa H, Tornwall O, Jussila M, Terwilliger J, Farkkila M, Kaprio J, Palotie A, Wessman M (2006) Testing of variants of the MTHFR and ESR1 genes in 1798 Finnish individuals fails to confirm the association with migraine with aura. *Cephalalgia* 26:1462-72
- Kavvoura FK, Ioannidis JP (2008) Methods for meta-analysis in genetic association studies: a review of their potential and pitfalls. *Hum Genet* 123:1-14
- Kelman L (2004) The premonitory symptoms (prodrome): a tertiary care study of 893 migraineurs. *Headache* 44:865-72
- Kelman L (2006) The postdrome of the acute migraine attack. *Cephalalgia* 26:214-20
- Kim WK, Kim HS, Kim WJ, Lee KY, Park H, Kim CH, Kim SJ, Choi YC (2005) Serotonin transporter gene polymorphism and migraine in the Korean population. *Headache* 45:1056-60
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525-8
- Kirchmann M, Thomsen LL, Olesen J (2006) The CACNA1A and ATP1A2 genes are not involved in dominantly inherited migraine with aura. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:250-6
- Knight J (2004) A survey of current software for genetic power calculations. *Hum Genomics* 1:225-7
- Komar AA (2007) Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics* 8:1075-80
- Kotani K, Shimomura T, Shimomura F, Ikawa S, Nanba E (2002) A polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region and frequency of migraine attacks. *Headache* 42:893-5
- Kovacs K, Bors L, Tothfalusi L, Jelencsik I, Bozsik G, Kerenyi L, Komoly S (1989) Cerebrospinal fluid (CSF) investigations in migraine. *Cephalalgia* 9:53-7
- Kowa H, Fusayasu E, Ijiri T, Ishizaki K, Yasui K, Nakaso K, Kusumi M, Takeshima T, Nakashima K (2005) Association of the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene in patients of migraine with aura. *Neurosci Lett* 374:129-31
- Kowa H, Yasui K, Takeshima T, Urakami K, Sakai F, Nakashima K (2000) The homozygous C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for migraine. *Am J Med Genet* 96:762-4
- Kroeze WK, Roth BL (1998) The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry* 44:1128-42

- Kusumi M, Araki H, Ijiri T, Kowa H, Adachi Y, Takeshima T, Sakai F, Nakashima K (2004) Serotonin 2C receptor gene Cys23Ser polymorphism: a candidate genetic risk factor of migraine with aura in Japanese population. *Acta Neurol Scand* 109:407-9
- Kusumi M, Ishizaki K, Kowa H, Adachi Y, Takeshima T, Sakai F, Nakashima K (2003) Glutathione S-transferase polymorphisms: susceptibility to migraine without aura. *Eur Neurol* 49:218-22
- Lancaster JM, Berchuck A, Carney ME, Wiseman R, Taylor JA (1998) Progesterone receptor gene polymorphism and risk for breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 78:277
- Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11:241-7
- Lane R, Davies P (2006) *Migraine*. Taylor & Francis Group, New York
- Larsson B, Bille B, Pedersen NL (1995) Genetic influence in headaches: a Swedish twin study. *Headache* 35:513-9
- Lashley K (1941) Patterns of cerebral integration indicated by scotomas of migraine. *Arch Neurol Psych* 46:331-9
- Lea RA, Curtain RP, Hutchins C, Brimage PJ, Griffiths LR (2001a) Investigation of the CACNA1A gene as a candidate for typical migraine susceptibility. *Am J Med Genet* 105:707-12
- Lea RA, Curtain RP, Shepherd AG, Brimage PJ, Griffiths LR (2001b) No evidence for involvement of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in susceptibility to typical migraine. *Am J Med Genet* 105:110-3
- Lea RA, Dohy A, Jordan K, Quinlan S, Brimage PJ, Griffiths LR (2000) Evidence for allelic association of the dopamine beta-hydroxylase gene (DBH) with susceptibility to typical migraine. *Neurogenetics* 3:35-40
- Lea RA, Nyholt DR, Curtain RP, Ovcacic M, Sciascia R, Bellis C, Macmillan J, Quinlan S, Gibson RA, McCarthy LC, Riley JH, Smithies YJ, Kinrade S, Griffiths LR (2005) A genome-wide scan provides evidence for loci influencing a severe heritable form of common migraine. *Neurogenetics* 6:67-72
- Lea RA, Ovcacic M, Sundholm J, MacMillan J, Griffiths LR (2004) The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant C677T influences susceptibility to migraine with aura. *BMC Med* 2:3
- Lea RA, Shepherd AG, Curtain RP, Nyholt DR, Quinlan S, Brimage PJ, Griffiths LR (2002) A typical migraine susceptibility region localizes to chromosome 1q31. *Neurogenetics* 4:17-22
- Leão A (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol* 7:359-90
- Lee H, Sininger L, Jen JC, Cha YH, Baloh RW, Nelson SF (2007a) Association of progesterone receptor with migraine-associated vertigo. *Neurogenetics* 8:195-200
- Lee KA, Jang SY, Sohn KM, Won HH, Kim MJ, Kim JW, Chung CS (2007b) Association between a polymorphism in the lymphotoxin-a promoter region and migraine. *Headache* 47:1056-62
- Leone M, Attanasio A, Croci D, Filippini G, D'Amico D, Grazzi L, Nespolo A, Bussone G (2000) The serotonergic agent m-chlorophenylpiperazine induces migraine attacks: A controlled study. *Neurology* 55:136-9
- Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P (1994) Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect* 95:157-62
- Levy D, Jakubowski M, Burstein R (2004) Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT 1B/1D receptor agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4274-9

## Bibliografia

- Ligthart L, Boomsma DI, Martin NG, Stubbe JH, Nyholt DR (2006) Migraine with aura and migraine without aura are not distinct entities: further evidence from a large Dutch population study. *Twin Res Hum Genet* 9:54-63
- Ligthart L, Nyholt DR, Hottenga JJ, Distel MA, Willemsen G, Boomsma DI (2008) A genome-wide linkage scan provides evidence for both new and previously reported loci influencing common migraine. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1186-95
- Link AS, Kuris A, Edvinsson L (2008) Treatment of migraine attacks based on the interaction with the trigemino-cerebrovascular system. *J Headache Pain* 9:5-12
- Lipton RB, Bigal ME (2005) The epidemiology of migraine. *Am J Med* 118 Suppl 1:3S-10S
- Lipton RB, Diamond S, Reed M, Diamond ML, Stewart WF (2001a) Migraine diagnosis and treatment: results from the American Migraine Study II. *Headache* 41:638-45
- Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M (2001b) Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache* 41:646-57
- Lisi V, Garbo G, Battistella P, Micciche F, Stecca A, Terrazzino S, Franzoi M, Tripoli E, Leon A, Clementi M (2006) Endothelin receptor A -231 G>A polymorphism: no linkage to primary pediatric headache. *Headache* 46:486-91
- Loder E, Harrington MG, Cutrer M, Sandor P, De Vries B (2006) Selected confirmed, probable, and exploratory migraine biomarkers. *Headache* 46:1108-27
- Lyngberg AC, Rasmussen BK, Jorgensen T, Jensen R (2005) Has the prevalence of migraine and tension-type headache changed over a 12-year period? A Danish population survey. *Eur J Epidemiol* 20:243-9
- M**acGregor EA (2004) Oestrogen and attacks of migraine with and without aura. *Lancet Neurol* 3:354-61
- MacGregor EA (2008) Menstrual migraine. *Curr Opin Neurol* 21:309-15
- Malsam J, Kreye S, Sollner TH (2008) Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65:2814-32
- Manivet P, Mouillet-Richard S, Callebert J, Nebigil CG, Maroteaux L, Hosoda S, Kellermann O, Launay JM (2000) PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J Biol Chem* 275:9324-31
- Manzoni GC, Torelli P (2008) Migraine with and without aura: a single entity? *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S40-3
- Martelletti P, Lulli P, Morellini M, Mariani B, Pennesi G, Cappellacci S, Brioli G, Giacobuzzo M, Trabace S (1999) Chromosome 6p-encoded HLA-DR2 determination discriminates migraine without aura from migraine with aura. *Hum Immunol* 60:69-74
- Martin VT, Behbehani M (2006a) Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis--part 2. *Headache* 46:365-86
- Martin VT, Behbehani M (2006b) Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis--part I. *Headache* 46:3-23
- Marziniak M, Herzog A, Mossner R, Sommer C (2008) Investigation of the functional brain-derived neurotrophic factor gene variant Val66MET in migraine. *J Neural Transm* 115:1321-5
- Marziniak M, Mossner R, Benninghoff J, Syagailo YV, Lesch KP, Sommer C (2004) Association analysis of the functional monoamine oxidase A gene promotor polymorphism in migraine. *J Neural Transm* 111:603-9
- Marziniak M, Mossner R, Schmitt A, Lesch KP, Sommer C (2005) A functional serotonin transporter gene polymorphism is associated with migraine with aura. *Neurology* 64:157-9
- Mascia A, Afra J, Schoenen J (1998) Dopamine and migraine: a review of pharmacological, biochemical, neurophysiological, and therapeutic data. *Cephalalgia* 18:174-82

- Mattsson P, Bjelfman C, Lundberg PO, Rane A (2000) Cytochrome P450 2D6 and glutathione S-transferase M1 genotypes and migraine. *Eur J Clin Invest* 30:367-71
- Maude S, Curtin J, Breen G, Collier D, Russell G, Shaw D, Clair DS (2001) The -141C Ins/Del polymorphism of the dopamine D2 receptor gene is not associated with either migraine or Parkinson's disease. *Psychiatr Genet* 11:49-52
- Mazaheri S, Hajilooi M, Rafiei A (2006) The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with migraine without aura. *J Neurol* 253:1589-93
- McCallum LK, Fernandez F, Quinlan S, Macartney DP, Lea RA, Griffiths LR (2007) Association study of a functional variant in intron 8 of the dopamine transporter gene and migraine susceptibility. *Eur J Neurol* 14:706-7
- McCarthy LC, Hosford DA, Riley JH, Bird MI, White NJ, Hewett DR, Peroutka SJ, et al. (2001) Single-nucleotide polymorphism alleles in the insulin receptor gene are associated with typical migraine. *Genomics* 78:135-49
- McCarthy MI, Hirschhorn JN (2008) Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. *Hum Mol Genet* 17:R156-65
- Mehler MF (2008) Epigenetics and the nervous system. *Ann Neurol* 64:602-17
- Mehrotra S, Gupta S, Chan KY, Villalon CM, Centurion D, Saxena PR, MaassenVanDenBrink A (2008) Current and prospective pharmacological targets in relation to antimigraine action. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378:371-94
- Miller MB, Schwander K, Rao DC (2008) Genotyping errors and their impact on genetic analysis. *Adv Genet* 60:141-52
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
- Mochi M, Cevoli S, Cortelli P, Pierangeli G, Scapoli C, Soriani S, Montagna P (2003a) Investigation of an LDLR gene polymorphism (19p13.2) in susceptibility to migraine without aura. *J Neurol Sci* 213:7-10
- Mochi M, Cevoli S, Cortelli P, Pierangeli G, Soriani S, Scapoli C, Montagna P (2003b) A genetic association study of migraine with dopamine receptor 4, dopamine transporter and dopamine-beta-hydroxylase genes. *Neurol Sci* 23:301-5
- Mochi M, Sangiorgi S, Cortelli P, Carelli V, Scapoli C, Crisci M, Monari L, Pierangeli G, Montagna P (1993) Testing models for genetic determination in migraine. *Cephalalgia* 13:389-94
- Montagna P (2008a) Migraine: a genetic disease? *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S47-51
- Montagna P (2008b) The primary headaches: genetics, epigenetics and a behavioural genetic model. *J Headache Pain* 9:57-69
- Moskowitz MA (2007) Genes, proteases, cortical spreading depression and migraine: impact on pathophysiology and treatment. *Funct Neurol* 22:133-6
- Moskowitz MA (2008) Defining a pathway to discovery from bench to bedside: the trigeminovascular system and sensitization. *Headache* 48:688-90
- Moskowitz MA, Bolay H, Dalkara T (2004) Deciphering migraine mechanisms: clues from familial hemiplegic migraine genotypes. *Ann Neurol* 55:276-80
- Mossner R, Weichselbaum A, Marziniak M, Freitag CM, Lesch KP, Sommer C, Meyer J (2005) A highly polymorphic poly-glutamine stretch in the potassium channel KCNN3 in migraine. *Headache* 45:132-6
- Mulder EJ, Van Baal C, Gaist D, Kallela M, Kaprio J, Svensson DA, Nyholt DR, Martin NG, MacGregor AJ, Cherkas LF, Boomsma DI, Palotie A (2003) Genetic and environmental influences on migraine: a twin study across six countries. *Twin Res* 6:422-31
- Musani SK, Shriner D, Liu N, Feng R, Coffey CS, Yi N, Tiwari HK, Allison DB (2007) Detection of gene x gene interactions in genome-wide association studies of human population data. *Hum Hered* 63:67-84



## Bibliografía

- N**agata E, Shibata M, Hamada J, Shimizu T, Katoh Y, Gotoh K, Suzuki N (2006) Plasma 5-hydroxytryptamine (5-HT) in migraine during an attack-free period. *Headache* 46:592-6
- Narbone MC, Gangemi S, Abbate M (2008) Migraine and stroke: from a questioned relationship to a supported comorbidity. *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S7-11
- Netzer C, Freudenberg J, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Goebel I, McCarthy LC, Roses AD, Gobel H, Todt U, Kubisch C (2008a) Replication study of the insulin receptor gene in migraine with aura. *Genomics* 91:503-7
- Netzer C, Freudenberg J, Toliat MR, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Thiele H, Goebel I, Nurnberg P, Ptacek LJ, Gobel H, Todt U, Kubisch C (2008b) Genetic association studies of the chromosome 15 GABA-A receptor cluster in migraine with aura. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:37-41
- Netzer C, Todt U, Heinze A, Freudenberg J, Zumbroich V, Becker T, Goebel I, Ohlraun S, Goebel H, Kubisch C (2006) Haplotype-based systematic association studies of ATP1A2 in migraine with aura. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141:257-60
- Nyholt DR, Curtain RP, Gaffney PT, Brimage P, Goadsby PJ, Griffiths LR (1996) Migraine association and linkage analyses of the human 5-hydroxytryptamine (5HT2A) receptor gene. *Cephalalgia* 16:463-7
- Nyholt DR, Curtain RP, Griffiths LR (2000) Familial typical migraine: significant linkage and localization of a gene to Xq24-28. *Hum Genet* 107:18-23
- Nyholt DR, Dawkins JL, Brimage PJ, Goadsby PJ, Nicholson GA, Griffiths LR (1998a) Evidence for an X-linked genetic component in familial typical migraine. *Hum Mol Genet* 7:459-63
- Nyholt DR, Gillespie NG, Heath AC, Merikangas KR, Duffy DL, Martin NG (2004) Latent class and genetic analysis does not support migraine with aura and migraine without aura as separate entities. *Genet Epidemiol* 26:231-44
- Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, Alakurtti K, Anttila V, Farkkila M, Hamalainen E, et al. (2008) A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet* 17:3318-31
- Nyholt DR, Lea RA, Goadsby PJ, Brimage PJ, Griffiths LR (1998b) Familial typical migraine: linkage to chromosome 19p13 and evidence for genetic heterogeneity. *Neurology* 50:1428-32
- Nyholt DR, Morley KI, Ferreira MA, Medland SE, Boomsma DI, Heath AC, Merikangas KR, Montgomery GW, Martin NG (2005) Genomewide significant linkage to migrainous headache on chromosome 5q21. *Am J Hum Genet* 77:500-12
- O**gilvie AD, Russell MB, Dhall P, Battersby S, Ulrich V, Smith CA, Goodwin GM, Harmar AJ, Olesen J (1998) Altered allelic distributions of the serotonin transporter gene in migraine without aura and migraine with aura. *Cephalalgia* 18:23-6
- Olesen J (2008) The International Classification of Headache Disorders. *Headache* 48:691-3
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mollenhauer HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543-52
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2766-70
- Oswell G, Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Anttila V, Kaprio J, Farkkila M, Wessman M, Palotie A (2008) No association of migraine to the GABA-A receptor complex on chromosome 15. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:33-6
- Oterino A, Castillo J, Pascual J, Cayon A, Alonso A, Ruiz-Alegria C, Valle N, Monton F, Ruiz-Lavilla N (2007a) Genetic association study and meta-analysis of the HTR2C Cys23Ser polymorphism and migraine. *J Headache Pain* 8:231-5

- Oterino A, Pascual J, Ruiz de Alegria C, Valle N, Castillo J, Bravo Y, Gonzalez F, Sanchez-Velasco P, Cayon A, Leyva-Cobian F, Alonso-Arranz A, Munoz P (2006) Association of migraine and ESR1 G325C polymorphism. *Neuroreport* 17:61-4
- Oterino A, Ruiz-Alegria C, Castillo J, Valle N, Bravo Y, Cayon A, Alonso A, Tejera P, Ruiz-Lavilla N, Munoz P, Pascual J (2007b) GNAS1 T393C polymorphism is associated with migraine. *Cephalalgia* 27:429-34
- Oterino A, Toriello M, Cayon A, Castillo J, Colas R, Alonson-Arranz A, Ruiz-Alegria C, Quintela E, Monton F, Ruiz-Lavilla N, Gonzalez F, Pascual J (2008) Multilocus analyses reveal involvement of the ESR1, ESR2, and FSHR genes in migraine. *Headache* 48:1438-50
- Oterino A, Valle N, Bravo Y, Munoz P, Sanchez-Velasco P, Ruiz-Alegria C, Castillo J, Leyva-Cobian F, Vadillo A, Pascual J (2004) MTHFR T677 homozygosis influences the presence of aura in migraineurs. *Cephalalgia* 24:491-4
- Oterino A, Valle N, Pascual J, Bravo Y, Munoz P, Castillo J, Ruiz-Alegria C, Sanchez-Velasco P, Leyva-Cobian F, Cid C (2005) Thymidylate synthase promoter tandem repeat and MTHFD1 R653Q polymorphisms modulate the risk for migraine conferred by the MTHFR T677 allele. *Brain Res Mol Brain Res* 139:163-8
- P**anconesi A, Sicuteri R (1997) Headache induced by serotonergic agonists--a key to the interpretation of migraine pathogenesis? *Cephalalgia* 17:3-14
- Pardo J, Carracedo A, Munoz I, Castillo J, Lema M, Noya M (1995) Genetic markers: association study in migraine. *Cephalalgia* 15:200-4
- Park JW, Han SR, Yang DW, Kim YI, Lee KS (2006) Serotonin transporter protein polymorphism and harm avoidance personality in migraine without aura. *Headache* 46:991-6
- Parmley JL, Hurst LD (2007) How do synonymous mutations affect fitness? *Bioessays* 29:515-9
- Paterna S, Di Pasquale P, Cottone C, Seidita G, Cardinale A, Parrinello G, Ferrari G, Licata G (1997) Migraine without aura and ACE-gene deletion polymorphism: is there a correlation? Preliminary findings. *Cardiovasc Drugs Ther* 11:603-4
- Paterna S, Di Pasquale P, D'Angelo A, Seidita G, Tuttolomondo A, Cardinale A, Maniscalchi T, Follone G, Giubilato A, Tarantello M, Licata G (2000) Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism determines an increase in frequency of migraine attacks in patients suffering from migraine without aura. *Eur Neurol* 43:133-6
- Peltonen L (2003) GenomEUtwin: a strategy to identify genetic influences on health and disease. *Twin Res* 6:354-60
- Peroutka SJ (1997) Dopamine and migraine. *Neurology* 49:650-6
- Peroutka SJ, Wilhoit T, Jones K (1997) Clinical susceptibility to migraine with aura is modified by dopamine D2 receptor (DRD2) Ncol alleles. *Neurology* 49:201-6
- Pietrobon D (2005) Migraine: new molecular mechanisms. *Neuroscientist* 11:373-86
- Pietrobon D (2007) Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4:274-84
- Pietrobon D, Striessnig J (2003) Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 4:386-98
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 6:847-59
- Pritchard JK, Rosenberg NA (1999) Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 65:220-8
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-59
- Purcell S, Cherny SS, Sham PC (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19:149-50
- Purdy RA (2008) Migraine with and without aura share the same pathogenic mechanisms. *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S44-6

## Bibliografia

- R**acchi M, Leone M, Porrello E, Rigamonti A, Govoni S, Sironi M, Montomoli C, Bussone G (2004) Familial migraine with aura: association study with 5-HT1B/1D, 5-HT2C, and hSERT polymorphisms. *Headache* 44:311-7
- Radat F, Swendsen J (2005) Psychiatric comorbidity in migraine: a review. *Cephalalgia* 25:165-78
- Rainero I, Dall'Omo AM, Rubino E, Valfre W, Fasano ME, Rivoiro C, Brancatello F, Savi L, Gallone S, Pinessi L (2006) HLA-DRB1 genotyping in Italian migraine patients. *Neurosci Lett* 393:90-3
- Rainero I, Grimaldi LM, Salani G, Valfre W, Rivoiro C, Savi L, Pinessi L (2004) Association between the tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A gene polymorphism and migraine. *Neurology* 62:141-3
- Rainero I, Grimaldi LM, Salani G, Valfre W, Savi L, Rivoiro C, Gentile S, Pinessi L (2002a) Apolipoprotein E gene polymorphisms in patients with migraine. *Neurosci Lett* 317:111-3
- Rainero I, Pinessi L, Salani G, Valfre W, Rivoiro C, Savi L, Gentile S, Giudice RL, Grimaldi LM (2002b) A polymorphism in the interleukin-1 $\alpha$  gene influences the clinical features of migraine. *Headache* 42:337-40
- Rainero I, Rubino E, Rivoiro C, Valfre W, Binello E, Zampella E, De Martino P, Gentile S, Fenoglio P, Savi L, Gallone S, Pinessi L (2007) Haemochromatosis gene (HFE) polymorphisms and migraine: an association study. *Cephalalgia* 27:9-13
- Rainero I, Salani G, Valfre W, Savi L, Rivoiro C, Ferrero M, Pinessi L, Grimaldi LM (2003) Absence of linkage between the interleukin-6 gene (-174 G/C) polymorphism and migraine. *Neurosci Lett* 343:155-8
- Rapoport AM (2008) Acute and prophylactic treatments for migraine: present and future. *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S110-22
- Rebaudengo N, Rainero I, Parziale A, Rosina F, Pavanelli E, Rubino E, Mazza C, Ostacoli L, Furlan PM (2004) Lack of interaction between a polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and the clinical features of migraine. *Cephalalgia* 24:503-7
- Rizo J, Rosenmund C (2008) Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:665-74
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-86
- Rubino E, Ferrero M, Rainero I, Binello E, Vaula G, Pinessi L (2007) Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with migraine: a meta-analysis. *Cephalalgia*
- Russell MB (2005) Tension-type headache in 40-year-olds: a Danish population-based sample of 4000. *J Headache Pain* 6:441-7
- Russell MB (2007) Genetics in primary headaches. *J Headache Pain* 8:190-5
- Russell MB (2008) Is migraine a genetic illness? The various forms of migraine share a common genetic cause. *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S52-4
- Russell MB, Iselius L, Olesen J (1995a) Inheritance of migraine investigated by complex segregation analysis. *Hum Genet* 96:726-30
- Russell MB, Olesen J (1995) Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine. *Bmj* 311:541-4
- Russell MB, Olesen J (1996) A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain* 119 ( Pt 2):355-61
- Russell MB, Rasmussen BK, Fenger K, Olesen J (1996) Migraine without aura and migraine with aura are distinct clinical entities: a study of four hundred and eighty-four male and female migraineurs from the general population. *Cephalalgia* 16:239-45
- Russell MB, Rasmussen BK, Thorvaldsen P, Olesen J (1995b) Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine. *Int J Epidemiol* 24:612-8

Russo L, Mariotti P, Sangiorgi E, Giordano T, Ricci I, Lupi F, Chiera R, Guzzetta F, Neri G, Gurrieri F (2005) A new susceptibility locus for migraine with aura in the 15q11-q13 genomic region containing three GABA-A receptor genes. *Am J Hum Genet* 76:327-33

**S**acks O (1970) *Migraine*. Paperback, Vintage Books

Sakai Y, Dobson C, Diksic M, Aube M, Hamel E (2008) Sumatriptan normalizes the migraine attack-related increase in brain serotonin synthesis. *Neurology* 70:431-9

Salas A, Carracedo A (2007) [Studies of association in complex diseases: statistical problems related to the analysis of genetic polymorphisms]. *Rev Clin Esp* 207:563-5

Sanchez del Rio M, Alvarez Linera J (2004) Functional neuroimaging of headaches. *Lancet Neurol* 3:645-51

Sanchez JJ, Phillips C, Borsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N (2006) A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 27:1713-24

Schaerlinger B, Hickel P, Etienne N, Guesnier L, Maroteaux L (2003) Agonist actions of dihydroergotamine at 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors and their possible relevance to antimigraine efficacy. *Br J Pharmacol* 140:277-84

Scher AI, Bigal ME, Lipton RB (2005) Comorbidity of migraine. *Curr Opin Neurol* 18:305-10

Scher AI, Terwindt GM, Verschuren WM, Kruit MC, Blom HJ, Kowa H, Frants RR, van den Maagdenberg AM, van Buchem M, Ferrari MD, Launer LJ (2006) Migraine and MTHFR C677T genotype in a population-based sample. *Ann Neurol* 59:372-5

Schmuck K, Ullmer C, Kalkman HO, Probst A, Lubbert H (1996) Activation of meningeal 5-HT<sub>2B</sub> receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur J Neurosci* 8:959-67

Schreiber CP (2006) The pathophysiology of migraine. *Dis Mon* 52:385-401

Schuh-Hofer S, Richter M, Geworski L, Villringer A, Israel H, Wenzel R, Munz DL, Arnold G (2007) Increased serotonin transporter availability in the brainstem of migraineurs. *J Neurol* 254:789-96

Schurks M, Kurth T, Ridker PM, Buring JE, Zee RY (2008) Association Between Polymorphisms in the beta2-adrenoceptor Gene and Migraine in Women. *Headache*

Schurks M, Limmroth V, Geissler I, Tessmann G, Savidou I, Engelbergs J, Kurth T, Diener HC, Roskopf D (2007) Association between migraine and the G1246A polymorphism in the hypocretin receptor 2 gene. *Headache* 47:1195-9

Schurks M, Zee RY, Buring JE, Kurth T (2009) Polymorphisms in the Renin-Angiotensin System and Migraine in Women. *Headache*

Schwaag S, Evers S, Schirmacher A, Stogbauer F, Ringelstein EB, Kühlenbaumer G (2006) Genetic variants of the NOTCH3 gene in migraine--a mutation analysis and association study. *Cephalalgia* 26:158-61

Serra SA, Cuenca-León E, Llobet A, Rubio-Moscardo F, Plata C, Carreño O, Fernández-Castillo N, Corominas R, Valverde MA, Macaya A, Cormand B, Fernández-Fernández JM A mutation in the first intracellular loop of CACNA1A prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers secretion efficiency: relevance to migraine phenotype. *PNAS* (Submitted)

Shepherd AG, Lea RA, Hutchins C, Jordan KL, Brimage PJ, Griffiths LR (2002) Dopamine receptor genes and migraine with and without aura: an association study. *Headache* 42:346-51

Sicuteri F (1977) Dopamine, the second putative protagonist in headache. *Headache* 17:129-31

Silberstein SD (2004) Migraine pathophysiology and its clinical implications. *Cephalalgia* 24 Suppl 2:2-7

Sollner TH (2003) Regulated exocytosis and SNARE function (Review). *Mol Membr Biol* 20:209-20

## Bibliografia

- Somerville BW (1972) The role of estradiol withdrawal in the etiology of menstrual migraine. *Neurology* 22:355-65
- Soragna D, Vettori A, Carraro G, Marchioni E, Vazza G, Bellini S, Tupler R, Savoldi F, Mostacciolo ML (2003) A locus for migraine without aura maps on chromosome 14q21.2-q22.3. *Am J Hum Genet* 72:161-7
- Stam AH, van den Maagdenberg AM, Haan J, Terwindt GM, Ferrari MD (2008) Genetics of migraine: an update with special attention to genetic comorbidity. *Curr Opin Neurol* 21:288-93
- Stankewitz A, May A (2007) Cortical excitability and migraine. *Cephalalgia* 27:1454-6
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978-89
- Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD, Reed ML (1992) Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *Jama* 267:64-9
- Stewart WF, Staffa J, Lipton RB, Ottman R (1997) Familial risk of migraine: a population-based study. *Ann Neurol* 41:166-72
- Stochino ME, Asuni C, Congiu D, Del Zompo M, Severino G (2003) Association study between the phenotype migraine without aura-panic disorder and dopaminergic receptor genes. *Pharmacol Res* 48:531-4
- Stovner L, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton R, Scher A, Steiner T, Zwart JA (2007) The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia* 27:193-210
- Stovner LJ, Andree C (2008) Impact of headache in Europe: a review for the Eurolight project. *J Headache Pain* 9:139-46
- Stovner LJ, Zwart JA, Hagen K, Terwindt GM, Pascual J (2006) Epidemiology of headache in Europe. *Eur J Neurol* 13:333-45
- Strachan T, Read AP (2005) *Human molecular genetics 3*. Garland Science, New York
- Supornsilpchai W, Sanguanrangsirikul S, Maneesri S, Srikiatkachorn A (2006) Serotonin depletion, cortical spreading depression, and trigeminal nociception. *Headache* 46:34-9
- Szilagyi A, Boor K, Orosz I, Szantai E, Szekely A, Kalasz H, Sasvari-Szekely M, Farkas V (2006) Contribution of serotonin transporter gene polymorphisms to pediatric migraine. *Headache* 46:478-85
- T**akeshima T, Fukuhara Y, Adachi Y, Ishizaki K, Kusumi M, Kowa H, Iigaya M, Sakai F, Nakashima K (2001) Leukocyte mitochondrial DNA A to G polymorphism at 11084 is not a risk factor for Japanese migraineurs. *Cephalalgia* 21:987-9
- Tapper W, Collins A, Gibson J, Maniatis N, Ennis S, Morton NE (2005) A map of the human genome in linkage disequilibrium units. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11835-9
- Terwindt GM, Ophoff RA, Haan J, Sandkuijl LA, Frants RR, Ferrari MD (1998) Migraine, ataxia and epilepsy: a challenging spectrum of genetically determined calcium channelopathies. Dutch Migraine Genetics Research Group. *Eur J Hum Genet* 6:297-307
- Thomsen LL, Eriksen MK, Roemer SF, Andersen I, Olesen J, Russell MB (2002) A population-based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria. *Brain* 125:1379-91
- Thomsen LL, Kirchmann M, Bjornsson A, Stefansson H, Jensen RM, Fasquel AC, Petursson H, Stefansson M, Frigge ML, Kong A, Gulcher J, Stefansson K, Olesen J (2007) The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine. *Brain* 130:346-56
- Thornton-Wells TA, Moore JH, Haines JL (2004) Genetics, statistics and human disease: analytical retooling for complexity. *Trends Genet* 20:640-7

- Tobler AR, Short S, Andersen MR, Paner TM, Briggs JC, Lambert SM, Wu PP, et al. (2005) The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *J Biomol Tech* 16:398-406
- Todt U, Dichgans M, Jurkat-Rott K, Heinze A, Zifarelli G, Koenderink JB, Goebel I, Zumbroich V, Stiller A, Ramirez A, Friedrich T, Gobel H, Kubisch C (2005) Rare missense variants in ATP1A2 in families with clustering of common forms of migraine. *Hum Mutat* 26:315-21
- Todt U, Freudenberg J, Goebel I, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Rietschel M, Gobel H, Kubisch C (2006a) Variation of the serotonin transporter gene SLC6A4 in the susceptibility to migraine with aura. *Neurology* 67:1707-9
- Todt U, Freudenberg J, Goebel I, Netzer C, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Gobel H, Kubisch C (2006b) MTHFR C677T polymorphism and migraine with aura. *Ann Neurol* 60:621-2; author reply 622-3
- Todt U, Netzer C, Toliat M, Heinze A, Goebel I, Nurnberg P, Gobel H, Freudenberg J, Kubisch C (2009) New genetic evidence for involvement of the dopamine system in migraine with aura. *Hum Genet*
- Toriello M, Oterino A, Pascual J, Castillo J, Colas R, Alonso-Arranz A, Ruiz-Alegria C, Quintela E, Monton F, Ruiz-Lavilla N (2008) Lack of association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and migraine. *Headache* 48:1115-9
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 4:13-25
- Trabace S, Brioli G, Lulli P, Morellini M, Giacobuzzo M, Cicciarelli G, Martelletti P (2002) Tumor necrosis factor gene polymorphism in migraine. *Headache* 42:341-5
- Tronvik E, Stovner LJ, Bovim G, White LR, Gladwin AJ, Owen K, Schrader H (2008) Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in migraine patients. *BMC Neurol* 8:4
- Tyce GM (1990) Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 3:S1-7
- Tzourio C, El Amrani M, Poirier O, Nicaud V, Bousser MG, Alperovitch A (2001) Association between migraine and endothelin type A receptor (ETA -231 A/G) gene polymorphism. *Neurology* 56:1273-7
- U**rich V, Gervil M, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB (1999) Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. *Ann Neurol* 45:242-6
- Ungar D, Hughson FM (2003) SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:493-517
- V**an de Ven RC, Kaja S, Plomp JJ, Frants RR, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD (2007) Genetic models of migraine. *Arch Neurol* 64:643-6
- van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD (2004) A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41:701-10
- Vanmolkot KR, Babini E, de Vries B, Stam AH, Freilinger T, Terwindt GM, Norris L, Haan J, Frants RR, Ramadan NM, Ferrari MD, Pusch M, van den Maagdenberg AM, Dichgans M (2007) The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies. *Mutation in brief* #957. Online. *Hum Mutat* 28:522
- Vanmolkot KR, Kors EE, Hottenga JJ, Terwindt GM, Haan J, Hoefnagels WA, Black DF, Sandkuijl LA, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM (2003) Novel mutations in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol* 54:360-6
- Vincent MB, Hadjikhani N (2007) Migraine aura and related phenomena: beyond scotomata and scintillations. *Cephalalgia* 27:1368-77

## Bibliografia

- W**ang GS, Cooper TA (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 8:749-61
- Welch KM (2003) Contemporary concepts of migraine pathogenesis. *Neurology* 61:S2-8
- Welch KM, Brandes JL, Berman NE (2006) Mismatch in how oestrogen modulates molecular and neuronal function may explain menstrual migraine. *Neurol Sci* 27 Suppl 2:S190-2
- Wessman M, Kallela M, Kaunisto MA, Marttila P, Sobel E, Hartiala J, Oswell G, Leal SM, Papp JC, Hamalainen E, Broas P, Joslyn G, Hovatta I, Hiekkalinna T, Kaprio J, Ott J, Cantor RM, Zwart JA, Ilmavirta M, Havanka H, Farkkila M, Peltonen L, Palotie A (2002) A susceptibility locus for migraine with aura, on chromosome 4q24. *Am J Hum Genet* 70:652-62
- Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A, Ophoff RA (2007) Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol* 6:521-32
- Wickner W, Schekman R (2008) Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:658-64
- Wolff H (1948) Headache and other head pain. Oxford University Press, New York
- Y**ang XS, Xu XP, Yang QD (2006) No association of C-1019G promoter polymorphism of 5-HT1A receptor gene with migraine. *Eur J Neurol* 13:533-5
- Yilmaz M, Erdal ME, Herken H, Cataluluk O, Barlas O, Bayazit YA (2001) Significance of serotonin transporter gene polymorphism in migraine. *J Neurol Sci* 186:27-30
- Yoon TY, Shin YK (2008) Progress in understanding the neuronal SNARE function and its regulation. *Cell Mol Life Sci*
- Z**hang W, Collins A, Maniatis N, Tapper W, Morton NE (2002) Properties of linkage disequilibrium (LD) maps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17004-7
- Zhao C, Slevin JT, Whiteheart SW (2007) Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett* 581:2140-9
- Ziegler A, Konig IR, Thompson JR (2008) Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J* 50:8-28
- Zondervan KT, Cardon LR (2004) The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 5:89-100
- Zondervan KT, Cardon LR (2007) Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nat Protoc* 2:2492-501